

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ÉTUDE MÉCANISTIQUE ET FONCTIONNELLE DE LA MT1-MMP
VIA LES CATÉCHINES DU THÉ VERT

PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE DE LA MAÎTRISE EN
BIOCHIMIE

PAR
DJAHIDA DJERIR

Février 2017

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.07-2011). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENT

Je tiens tout d'abord à adresser mes sincères remerciements à mon directeur de recherche, le Dr. Borhane Annabi, merci pour la confiance qu'il m'a accordée et pour m'avoir chaleureusement accueillie au sein de son équipe de recherche. Je le remercie pour son encadrement scientifique, ses précieux conseils et ses gratifiants encouragements.

Je remercie le Dr. Steve Bourgault pour m'avoir donné libre accès à son laboratoire et pour sa précieuse expertise de la résonance plasmonique de surface. Un grand merci à son étudiante Phuong Trang Nguyen pour le temps qu'elle m'a accordé, ses conseils et sa patience.

Mes vifs remerciements à Julie Poirier et Annie Levert pour leur soutien technique et leur bonne humeur toujours au rendez vous.

Je remercie également mes collègues qui sont devenus mes amis (es) au fil du temps, Amira, Amélie, Cyndia, Clémence, Evelyne, Mustapha, Jonhathan, Alain, David, Samuel. S, Samuel. B

Les remerciements ne sauraient témoigner de ma gratitude envers mes parents, mon époux ainsi que mes frères pour leur soutien, leur encouragement et leur présence dans mon parcours académique et personnel.

Un grand merci à la fondation de l'UQÀM ainsi qu'au programme des fonds d'accessibilité à la recherche (FARE) pour m'avoir octroyé une bourse d'excellence durant mes études de maîtrise.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|---|-----|
| Remerciements..... | iii |
| Liste des figures | vi |
| Liste des tableaux..... | vii |
| Liste des abréviations..... | x |
| Résumé..... | xi |
| Mots clés | xii |
| Chapitre I | |
| Introduction | 1 |
| 1.1 Cancer et Glioblastomes | 1 |
| 1.1.1 Définition | 1 |
| 1.1.2 Généralités..... | 1 |
| 1.1.3 Cancérogenèse..... | 2 |
| 1.1.4 Les tumeurs cérébrales | 5 |
| 1.2 Phénotype invasif associé à la progression tumorale..... | 7 |
| 1.2.1 L'angiogenèse..... | 7 |
| 1.2.2 L'inflammation | 10 |
| 1.2.3 La migration cellulaire | 12 |
| 1.3 Les métalloprotéinases de la matrice extracellulaire | 15 |
| 1.3.1 La matrice extracellulaire..... | 16 |
| 1.3.2 Classification et structure..... | 16 |
| 1.3.3 Les fonctions de la MT1-MMP | 21 |
| 1.3.4 L'implication de la MT1-MMP dans la signalisation cellulaire..... | 21 |
| 1.3.5 L'implication de la MT1-MMP dans le développement tumoral | 22 |
| 1.3.6 Les inhibiteurs synthétiques et naturels des métalloprotéinases | 25 |
| 1.3.7 Inhibition des MMPs par les polyphénols..... | 25 |

| | |
|--|----|
| 1.4 Méthode d'analyse expérimentale de l'interaction entre les catéchines et les complexes protéiques de MMPs : la résonance plasmonique de surface..... | 30 |
| Chapitre II | |
| Projet de recherche | 33 |
| 2.1 Problématique et hypothèse de travail | 33 |
| 2.2 Objectif de recherche | 34 |
| Chapitre III | |
| Evidence for green tea catechins molecular binding targets in MT1-MMP-mediated signalling and proteolytic functions | 36 |
| 3.1 Abstract | 37 |
| 3.2 Introduction | 39 |
| 3.3 Experimental procedures..... | 42 |
| 3.4 Results | 45 |
| 3.5 Discussion | 48 |
| 3.6 Acknowledgement..... | 53 |
| 3.7 References | 54 |
| 3.8 Abbreviations | 66 |
| 3.9 Figure Legends..... | 68 |
| Chapitre IV | |
| Discussion | 82 |
| Chapitre V | |
| Conclusion et perspectives | 88 |
| Références | 89 |

Liste de figures

| Figure | page |
|--|------|
| 1.1 Les différentes étapes de la cancérogenèse..... | 3 |
| 1.2 Caractère phénotypique des cellules tumorales..... | 4 |
| 1.3 La balance entre différentes molécules pro-angiogéniques et anti-angiogéniques régit le «Switch angiogénique»..... | 9 |
| 1.4 La biosynthèse des prostaglandines..... | 11 |
| 1.5 Les étapes de la migration mésoenchymateuse..... | 14 |
| 1.6 Classification des MMPs..... | 18 |
| 1.7 Structure de la MT1-MMP..... | 19 |
| 1.8 Classification des MMPs en fonction de leurs différences structurales..... | 20 |
| 1.9 Les rôles des MMPs au niveau de la progression tumorale..... | 24 |
| 1.10 Différents inhibiteurs tissulaires des MMPs impliqués au niveau de la progression tumorale..... | 27 |
| 1.11 Structure moléculaire des différentes catéchines contenues dans le thé vert..... | 30 |
| 1.12 Principe de résonance plasmonique de surface..... | 32 |
| 2.1 Scheme of MT1-MMP predicted interactors and molecular structure of green tea-derived catechins..... | 71 |
| 2.2 Impact of catechins on Concanavalin-A-induced MT1-MMP expression in U87 glioblastoma cells..... | 72 |
| 2.3 Impact of catechins on Concanavalin-A-induced GRP78 expression in U87 glioblastoma cells..... | 73 |
| 2.4 Impact of catechins on Concanavalin-A-induced proMMP-2 activation in U87 glioblastoma cells..... | 74 |
| 2.5 Direct interaction assessment by SPR between MT1-MMP and catechins..... | 75 |
| 2.6 Direct interaction assessment by SPR between MMP-2 and catechins..... | 76 |
| 2.7 Direct interaction assessment by SPR between TIMP-2 and catechins..... | 77 |
| 2.8 Direct interaction assessment by SPR between MTCBP-1 and catechins..... | 78 |
| 2.9 Direct interaction assessment by SPR between LRP-1 and catechins..... | 80 |
| 2.10 Kd constants and catechins affinity ranking towards MT1-MMP interactors..... | 81 |

Liste des tableaux

| Tableau | page |
|--|------|
| 1.1 Classification des astrocytomes selon l'Organisation Mondiale de la Santé..... | 6 |

Liste des abréviations

| | |
|--------------|---|
| C | Catéchines |
| CDC42 | <i>Cell division control protein 42 homolog</i> |
| CG | Catéchine gallate |
| ConA | Concanavalline A |
| COX-2 | Cyclooxygénase-2 |
| EC | Épicatéchine |
| ECG | Épicatéchine gallate |
| EGC | Épigallocatechine |
| EGCG | Épigallocatechine 3-gallate |
| EGF | Facteur de croissance épidermal |
| FGF | Facteur de croissance des fibroblastes |
| GC | Gallocatechine |
| GCG | Gallocatechine gallate |
| GPI | Glycosylphosphatidylinositol |
| GTPase | Guanosine triphosphate |
| IL-I β | Interleukine-I beta |
| MEC | Matrice extracellulaire |
| MMP2 | Métalloprotéinase matricielle 2 |

| | |
|------------------|--|
| MMPs | Métalloprotéinases matricielle |
| MT1-MMP | Métalloprotéinase matricielle membranaire de type-1 |
| OMS | Organisation Mondiale de la Santé |
| PGs | Prostaglandines |
| PGD ₂ | Prostaglandine D ₂ |
| PGE ₂ | Prostaglandine E ₂ |
| Rac1 | <i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i> |
| Ras | <i>Protein superfamily of small GTPases</i> |
| Rho | <i>Ras homolog gene family member A</i> |
| RECK | <i>Reversion-inducing-Cystein rich protein with Kazal motifs</i> |
| SNC | Système nerveux central |
| TIMP2 | Inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases 2 |
| TIMPs | Inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases |
| TNF- α | Facteur de nécrose tumorale alpha |
| TSP1 | Thrombospondine-1 |
| U87 | Lignée cellulaire dérivée d'un glioblastome humain |
| VEGF | Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire |

RÉSUMÉ

Depuis des décennies, l'implication de la métalloprotéinase membranaire de type-1 (MT1-MMP) dans la progression tumorale est scrutée au sein de nombreuses pathologies. En effet, durant la progression du cancer, les cellules tumorales envahissent les tissus environnants afin de s'y infiltrer. Par conséquent, elles devront exprimer ou sécréter à leur surface des métalloprotéinases matricielles (MMPs) qui sont entre autre responsables du remodelage de la matrice extracellulaire (MEC). La MT1-MMP joue un rôle déterminant dans l'acquisition du potentiel invasif des cellules tumorales cérébrales. Le ciblage pharmacologique de la MT1-MMP et de ses partenaires serait une approche thérapeutique ou chimiopréventive idéale pour le ciblage du potentiel invasif des glioblastomes. Des études ont préalablement démontré que l'activation de la pro-MMP2 se fait via la formation d'un complexe ternaire, impliquant l'interaction de son domaine C-terminal avec la MT1-MMP et TIMP2. Une fois activée, la MMP2 assure la dégradation de la MEC. De plus, d'autres études ont démontré la contribution de l'épigallocatechine 3-gallate, une molécule phytochimique du thé vert, dans l'inhibition de la dégradation de la MEC assurée par les MMPs. La capacité des autres catéchines, dérivées du thé vert, à inhiber les MMPs, dont MT1-MMP, a été peu investiguée.

Ainsi, la présente étude avait pour objectif d'identifier les interactions possibles entre les molécules des catéchines avec la MT1-MMP et ses partenaires, soit MMP2, TIMP2, LRP1-Cluster IV et MTCBP. Pour ce faire, des constantes de dissociation ont été mesurées par résonance plasmonique de surface. De plus, nous avons aussi étudié l'effet des catéchines sur la contribution de la MT1-MMP dans l'activation de la proMMP2. Pour ce faire, nous avons induit, à l'aide de la Concanavaline A, l'expression de la MT1-MMP dans des cellules de glioblastomes U87. Parallèlement, les cellules ont été traitées avec les catéchines, afin de suivre leurs effets sur l'activation de la proMMP2, par zymographie. De plus, nous avons évalué l'impact des catéchines sur l'induction de la MT1-MMP, elle même, ainsi que sur l'expression du biomarqueur de stress du réticulum endoplasmique, GRP78. Le groupement gallate retrouvé sur certaines catéchines semble être important dans la liaison des diverses molécules sur MT1-MMP et ses partenaires. Ces mêmes molécules inhibent l'induction de la MT1-MMP, l'expression de GRP78 et l'activation de la proMMP2 et par conséquent empêchent le remodelage de la MEC, processus essentiel à la progression du cancer.

Mots Clés

Métalloprotéinases, Polyphénols, Catéchines, Résonnance plasmonique de surface, Glioblastomes, Cancer.

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Cancer et glioblastomes

1.1.1 Définition

Le terme général de « cancer » désigne un vaste groupe de pathologies qui prend naissance au sein d'une cellule et qui affecte plusieurs fonctions des tissus de l'organisme (Organisation mondiale de la santé, 2015). Le cancer se caractérise par ce qu'on appelle des tumeurs malignes et/ou néoplasmes qui ont la capacité de proliférer de façon non régulée et d'activer plusieurs signaux cellulaires afin d'assurer le maintien et la survie des cellules cancéreuses pour envahir les tissus voisins et ainsi se répandre dans l'organisme (Organisation mondiale de la santé, 2015).

1.1.2 Généralités

La « grande faucheuse » du XXI^e siècle est inévitablement le cancer, une maladie à ce jour énigmatique et dévastatrice. En effet, selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le cancer est parmi les principales causes de décès sur la planète à l'origine de 8,2 millions de décès et 14 millions de nouveaux cas, en 2012 (OMS). Au Canada, les statistiques de la Société Canadienne du Cancer estiment que près de la moitié des canadiens développeront un cancer au cours de leur vie et prévoient que le quart en mourra (Société Canadienne du Cancer). Grâce aux nombreuses découvertes récentes des recherches médicales, fondamentales et épidémiologiques, nous savons maintenant que la majorité des cancers n'est pas due à un jeu de hasard ou à une conséquence du vieillissement, mais plutôt aux facteurs de risque comportementaux et alimentaires du monde occidental moderne (Béliveau et Gingras, 2014).

La progression des cellules cancéreuses est directement liée aux effets du tabagisme, du surpoids, de la sédentarité et de l'alimentation. Ainsi, près des trois quarts des cas de cancer pourraient être prévenus par de simples changements de nos habitudes de vie (Béliveau et Gingras, 2014).

1.1.3 La cancérogenèse

La cancérogenèse regroupe l'ensemble des phénomènes impliqués dans la transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse (Aggarwal et Shishodia, 2006). Cette transformation est un processus évolutif complexe qui se développe en trois étapes principales de durée variable : l'initiation, la promotion et la progression tumorale (Aggarwal et Shishodia, 2006). En effet, tout commence par la phase d'initiation, une phase irréversible, durant laquelle une mutation génétique apparaît, sous l'action de plusieurs agents autant endogènes qu'exogènes et des facteurs cancérogènes. Ensuite, la cellule entre en phase de promotion, où elle échappe au processus de réparation de l'ADN et prolifère de façon incontrôlée. De plus, cette phase se traduit par une auto suffisance aux facteurs de croissances ainsi qu'une insensibilité aux signaux d'arrêt de croissance. La dernière phase de la cancérogenèse est la progression, durant laquelle les cellules prolifèrent continuellement, et où apparaît une activation des oncogènes et une inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs (Aggarwal et Shishodia, 2006).

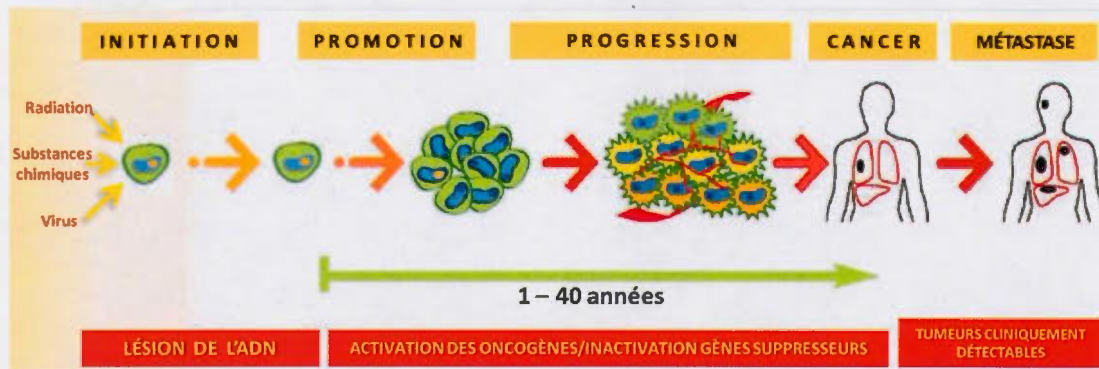


Figure 1 : Les différentes étapes de la cancérogenèse. Des agents cancérogènes affectent une cellule saine ce qui va initier la cancérogenèse. Ensuite, la cellule initiée entre en phase de promotion caractérisée par une prolifération incontrôlée en raison des lésions au niveau de l'ADN. Finalement, une activation des oncogènes et une inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs permettent aux cellules d'entrer en phase de progression où le cancer s'établit et devient cliniquement détectable.

[Adapté de : Béliveau et Gingras, 2007]

La transformation phénotypique d'une cellule saine en cellule cancéreuse, qui a lieu durant la cancérogenèse, entraîne des changements biochimiques fondamentaux (Hanahan et Weinberg, 2000). Premièrement, les cellules perdent la régulation des signaux de la prolifération cellulaire. Deuxièmement, elles deviennent insensibles aux signaux antiprolifératifs. Troisièmement, elles acquièrent un potentiel invasif et métastatique, quatrièmement, la capacité de réplication devient illimitée (immortalisation), cinquièmement, la capacité de néoangiogenèse et finalement elles échappent à la mort cellulaire programmée (apoptose) (Hanahan et Weinberg, 2000).

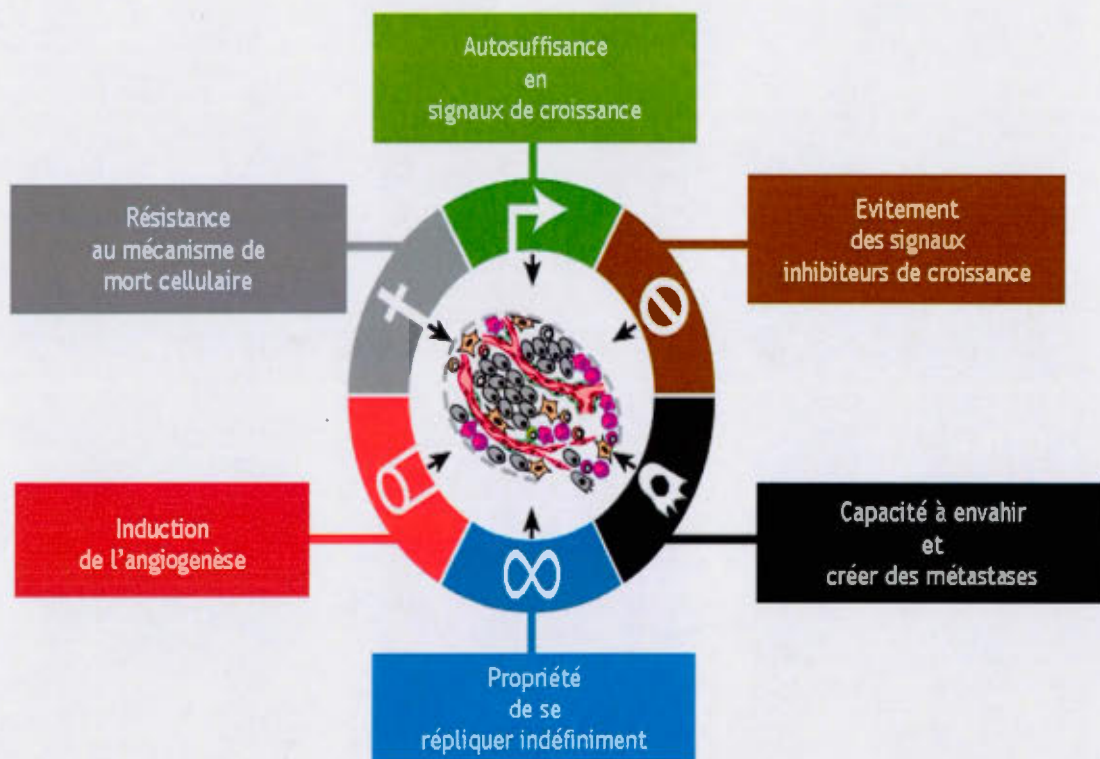


Figure 2 : Caractère phénotypique des cellules tumorales. L'acquisition de nouveaux phénotypes spécifiques confère aux cellules des mécanismes qui régulent la prolifération, la survie et l'invasion tumorale pour constituer le cancer.

[Adapté de : Hanahan et Weinberg, 2000]

1.1.4 Les tumeurs cérébrales

Les cellules gliales forment le tissu de support cérébral, la glie. Localisées autour du corps cellulaire, des axones et des dendrites, les cellules gliales sont divisées en 2 classes : les microglies et les macroglies (Ballabh et al, 2004). La classe des microglies comprend les macrophages provenant de l'extérieur du système nerveux central (SNC). Elles serviraient de cellules présentatrices d'antigènes puisqu'elles sont mises en action lors des processus infectieux, inflammatoires et dans des états pathologiques comme la maladie d'Alzheimer. La seconde classe formant les macroglies est subdivisée en deux types cellulaires, les oligodendrocytes et les astrocytes (Lee et al, 2006). Les oligodendrocytes sont des cellules du SNC qui entourent les neurones produisant ainsi la myéline essentielle pour l'isolement des axones et la transmission du potentiel d'action. Les astrocytes sont aussi des cellules du SNC, elles procurent les nutriments et assurent l'homéostasie du microenvironnement. Étroitement liés aux cellules endothéliales, les astrocytes sont impliqués dans le développement et dans le maintien de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique (Lee et al, 2006). Les astrocytomes représentent 90% des gliomes, donc 50% des tumeurs intracrâniennes (Ballabh et al, 2004). D'après la classification histologique de l'OMS, les astrocytomes sont regroupés selon le grade tumoral suivant : les astrocytomes pilocytiques (grade I), les astrocytomes fibrillaires (grade II), les astrocytomes anaplasiques (grade III) et les glioblastomes (grade IV).

Tableau 1. Classification des astrocytomes selon l'Organisation Mondiale de la Santé.

| <i>Tumeur</i> | <i>Grade histologique</i> | <i>Critères histologiques</i> | <i>Taux de survie relatif à 10 ans</i> |
|--------------------------------|---------------------------|--|--|
| <i>Astrocytome pilocytaire</i> | I | Prolifération cellulaire anarchique | 89,3 % |
| <i>Astrocytome diffus</i> | II | Atypies nucléaires discrètes | 38,7 % |
| <i>Astrocytome anaplasique</i> | III | Atypies importantes avec mitoses | 22,2 % |
| <i>Glioblastome</i> | IV | Atypies importantes avec mitoses, nécrose et/ou prolifération endothéliale | 2,3 % |

Exemple de classification de tumeurs cérébrales par l'OMS, selon le grade de malignité en fonction des critères histologiques et du taux de survie relatif à 10 ans.

[Adapté de Kleihues et al. 2002.]

Les glioblastomes multiformes sont des tumeurs cérébrales rares mais représentent près de la moitié des tumeurs primitives du cerveau (Louis et al, 2007). Selon l'OMS, soixante-quinze pour cent des gliomes diagnostiqués sont de hauts grades (III et IV).

De plus, la classification des tumeurs gliales repose sur leur histologie, le phénotype des cellules tumorales et leur grade de malignité (Organisation Mondiale de la Santé). En effet, ces tumeurs sont classées selon le type cellulaire, les astrocytomes, les oligodendrogliomes et les épendymomes étant les plus fréquents. Les glioblastomes multiformes catalogués parmi les astrocytomes de grade IV, sont les plus agressifs, envahissants et dévastateurs (Louis et al, 2007).

1.2 Phénotype invasif associé à la progression tumorale

1.2.1 L'angiogenèse

L'angiogenèse constitue la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants, aussi connu sous le nom de néovascularisation (Folkman, 2002). La néovascularisation est un processus physiologique important qui permet la formation de réseaux vasculaires indispensables pour alimenter les tissus en oxygène et en nutriments, via la circulation sanguine par des capillaires sanguins d'environ 100 à 200µm, distance à laquelle l'oxygène diffuse à travers les tissus (Folkman, 2002). Ainsi, l'angiogenèse est impliquée dans de nombreux processus physiologiques incluant le développement embryonnaire, le renouvellement des tissus, la croissance de l'endomètre et la cicatrisation (Folkman, 1995). Dans la mesure où l'angiogenèse est un processus normal, elle demeure très régulée et ne dure qu'un court laps de temps avant d'être inhibée (Folkman, 1995). Cependant, la perte de la régulation des mécanismes qui régissent l'angiogenèse alimente le développement de pathologies, notamment le développement tumoral menant au cancer, c'est alors qu'on la qualifie d'angiogenèse tumorale (Folkman, 1995). L'angiogenèse est nécessaire à la croissance d'une tumeur et à la formation de métastases invasives. En effet, elle constitue un point de repère dans la progression du cancer (Folkman, 2002). Pour assurer son développement au niveau de la taille et du potentiel métastatique, une tumeur doit initier un « switch » angiogénique (Munoz-Chapuli, 2011). Ce dernier se traduit par le débalancement des facteurs pro-angiogéniques et des facteurs anti-angiogéniques (Hanahan et Weinberg, 2000). En effet, durant le « switch » angiogénique, les cellules tumorales augmentent notamment, l'expression du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) ainsi que du facteur de croissance des fibroblastes (FGF) (Hanahan et Weinberg, 2000).

De plus, certaines cellules tumorales diminuent l'expression de certains inhibiteurs endogènes de l'angiogenèse, comme l'interféron- β ou la thrombospondine-1 (TSP1) (Hanahan et Weinberg, 2000, Bikfalvi, 2003 et Bhushan et al., 2002). Le « switch » angiogénique est stoppé par les molécules anti-angiogéniques qui neutralisent l'effet des molécules pro-angiogéniques. Toutefois, lorsque le débalancement est en faveur des signaux pro-angiogéniques, il se traduit par une angiogenèse soutenue. Par ailleurs, le « switch » angiogénique, est favorisé par différents éléments génétiques, métaboliques et inflammatoires (Munoz-Chapuli, 2011 et Munoz-Chapuli et al, 2004).

L'angiogenèse tumorale est donc un processus actif et complexe qui implique la production et la sécrétion des facteurs angiogéniques par les cellules tumorales, permettant aux cellules endothéliales de proliférer et de sécréter des protéases, incluant des métalloprotéases matricielles (MMPs) et des activateurs du plasminogène, assurant ainsi la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC), le changement des propriétés d'adhésion, la migration, l'échappement à l'apoptose et la différenciation en nouveaux vaisseaux (Bikfalvi, 2003).

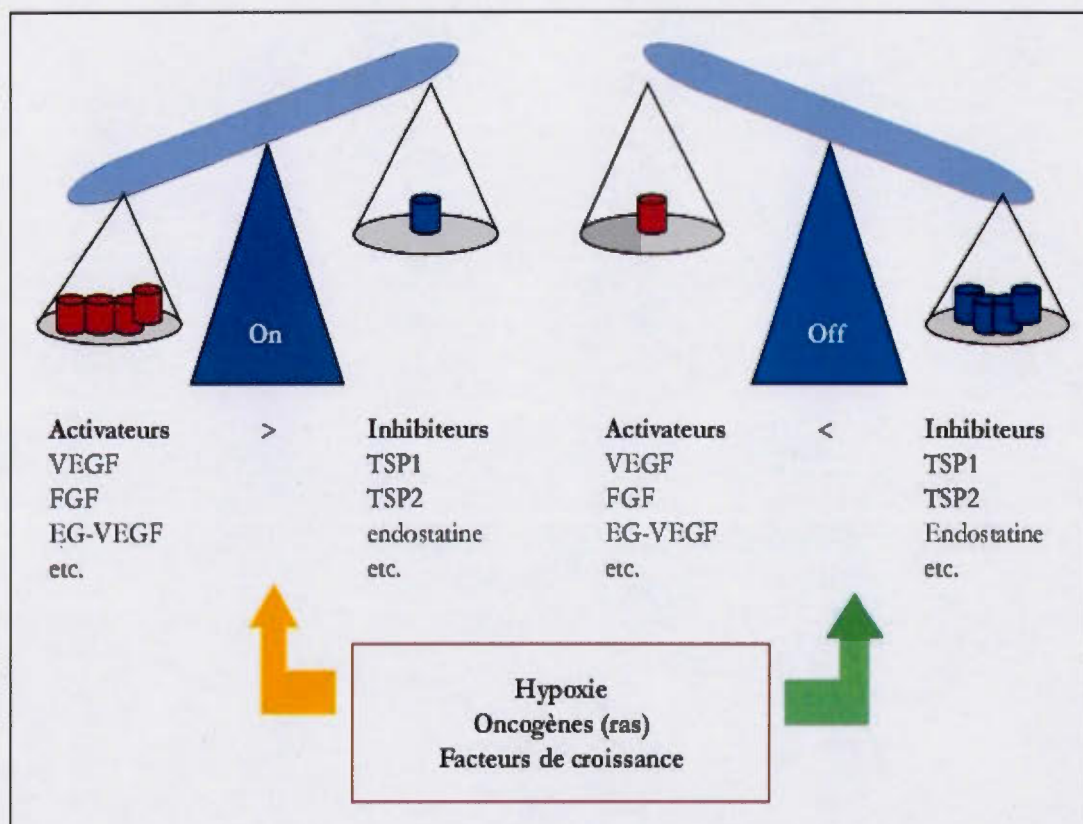


Figure 3 : La balance entre différentes molécules pro-angiogéniques et anti-angiogéniques régit le «Switch angiogénique». De nombreux facteurs interviennent afin de favoriser ou inhiber l'angiogenèse. En effet, les facteurs de croissance vasculoendothéliaux et fibroblastiques sont proangiogéniques, tandis que l'angiostatine et les facteurs plaquettaires sont anti-angogéniques.

Abréviation : VEGF : vascular endothelial growth factor; FGF : fibroblast growth factor; EG-VEGF : endocrine gland vascular endothelial growth factor; TSP1 : thrombospondine 1; TSP2 : thrombospondine 2.

[Adapté de : Bikfalvi, 2003]

1.2.2 L'inflammation

Une inflammation est une réaction de défense immunitaire dont la principale fonction est de répondre à une agression subite afin de restaurer l'homéostasie dans l'organisme. En effet, lorsqu'un tissu est agressé, les processus d'inflammation sont déclenchés pour réparer les lésions (Fernandes et al., 2015). De façon générale, elle est divisée en trois étapes, soit l'inflammation aiguë, la réponse immune et l'inflammation chronique (Fernandes et al., 2015). Une inflammation aiguë est caractérisée par l'expression et la sécrétion de médiateurs solubles, telles les cytokines. Cet aspect de l'inflammation peut être détourné par les tumeurs pour qu'elles puissent se développer. En effet, la réponse inflammatoire est régie par une libération de cytokines pro-inflammatoires et immuno-régulatrices qui procure un microenvironnement favorable pour la progression du cancer (Fernandes et al., 2015). Les interleukines IL-6 et IL-1 β sont des cytokines pro-inflammatoires jouant un rôle important dans le cancer car elles sont des intermédiaires cruciaux dans la formation des cancers mettant en relation l'inflammation (Rath et al., 2015).

Les cyclo-oxygénases (COX) sont des glycoprotéines induites par un ensemble de facteurs pro-inflammatoires, de cytokines, de facteurs de croissance, d'oncogènes et de promoteurs de tumeurs. La COX-2 est exprimée durant les premières étapes de la cancérogenèse, elle catalyse une étape importante dans la conversion de l'acide arachidonique en une série de prostaglandines telles que PGE₂ et PGD₂ (Méric et Spano, 2006). Ces prostaglandines jouent un rôle crucial dans plusieurs processus biologiques, y compris la régulation de la fonction immunitaire, le développement du rein, la reproduction et l'intégrité gastro-intestinale (Méric et Spano, 2006). Ainsi, la COX-2 est présente dans les tissus normaux, en plus d'être détectée au niveau des cellules néoplasiques, inflammatoires, endothéliales et stromales. Elle joue un rôle dans la synthèse d'agents mutagènes tels le malonaldéhyde et dans la production

d'hydroxydes conduisant à l'activation de carcinogènes. De plus, la COX-2 est impliquée dans le processus de cancérogenèse puisqu'elle favorise la prolifération tumorale, les mécanismes de résistance à l'apoptose, l'angiogenèse et l'invasion tumorale des tissus sains.

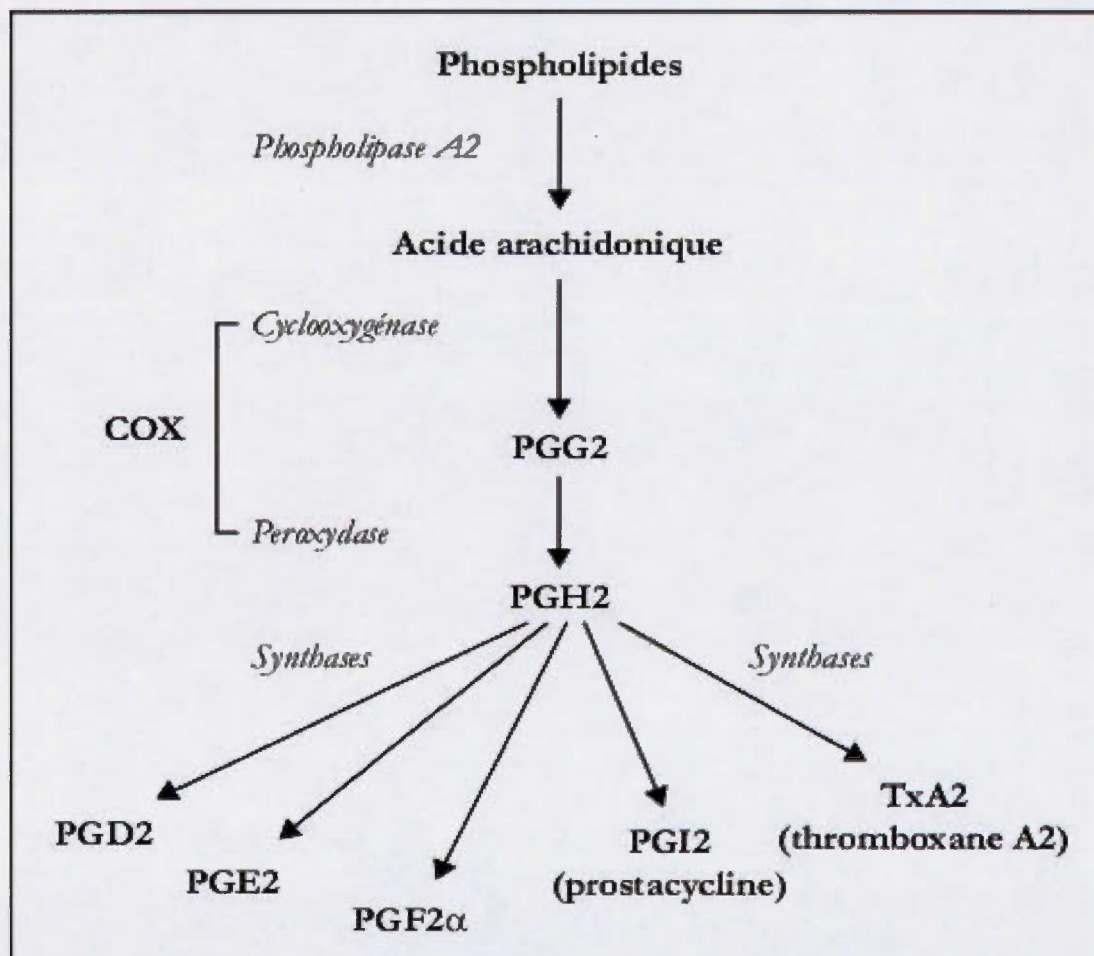


Figure 4 : La biosynthèse des prostaglandines. Les cyclooxygénases catalysent la production de PGH2 à partir de l'oxydation de l'acide arachidonique permettant la synthèse de d'autres prostaglandines (PGD2, PGF2α, PGE2, TxA2, PGI2).

Abréviation : COX : cyclooxygénase; PG : prostaglandine; PGH2 : prostaglandine H2; PGD : prostaglandine D; PGF : prostaglandine F; PGE : prostaglandine E; PGI : prostacycline; PGE2 : prostaglandine E2; TX : thromboxane; TxA2 : thromboxane A2

[Adapté de : Méric et Spano, 2006]

1.2.3 La migration cellulaire

La migration cellulaire est un processus complexe et très coordonné durant lequel la forme et la rigidité des cellules sont modifiées pour qu'elles puissent interagir avec la MEC. En effet, outre la barrière qu'elle représente pour la cellule, la MEC lui fournit des substrats afin de permettre sa migration. De plus, les cellules tumorales peuvent migrer aussi bien individuellement qu'en groupe. Lorsque la cellule migre seule, la migration peut se dérouler de deux façons différentes, soit la migration mésenchymateuse et la migration de type amiboïde (Friedl et Wolf, 2003). Les cellules tumorales qui utilisent la migration mésenchymateuse proviennent principalement des tissus conjonctifs tels que les fibrosarcomes (Wolf et al, 2003) et les gliomes (Paulus et al, 1996) et certains cancers épithéliaux (Polette et al, 1998).

La migration mésenchymateuse nécessite, en partie, la présence des intégrines ainsi que des protéases (Friedl et Wolf, 2003). Tout d'abord, afin d'initier le processus de migration mésenchymateuse, la cellule se polarise et prend une forme allongée. Ainsi, la migration cellulaire s'effectue en cinq étapes. En effet, lorsque la cellule se polarise, elle forme des protrusions de la membrane cellulaire appelée pseudopodes au niveau du front de migration. De plus, la polymérisation de l'actine corticale projette la membrane vers l'avant. Cette polymérisation fait intervenir des protéines G, incluant les GTPase RAC, CDC42, RHO, et RAS (Kaibuchi, Kuroda et Amano, 1999). La formation des points focaux d'adhérence entraîne le recrutement de protéines adaptatrices et les intégrines s'ancrent au cytosquelette d'actine afin de former des points d'ancrage du cytosquelette. La formation de complexes d'adhésion focale, c'est à dire l'interaction des cellules avec la MEC amène le recrutement de protéases de surface telles que les métalloprotéases (MMPs). Une fois activées, ces dernières clivent la MEC. Une des principales MMPs responsable de la protéolyse est

la métalloprotéinase transmembranaire de type 1 (MT1-MMP) qui clive les composantes de la MEC telles la fibronectine, le collagène et les laminines, ainsi que les proMMPs comme la proMMP2 (Ohiuchi et al, 1997). Durant la formation des complexes d'adhésion focaux et la dégradation de la MEC, la cellule se contracte. Pour ce faire, la myosine se lie aux fibres d'actines polymérisées générant ainsi une force de contraction permettant de faire avancer l'arrière de la cellule. Finalement, la dernière étape de la migration cellulaire consiste en un détachement de l'arrière de la cellule. En effet, les points focaux d'adhérence se séparent entraînant ainsi le détachement de l'arrière de la cellule pendant que les pseudopodes, situés en amont de la cellule, restent adhérents et s'allongent. Pendant ce temps, il y a aussi internalisation et recyclage des intégrines au niveau des pseudopodes. La cellule glisse lentement vers l'avant alors que toutes les étapes de migration se reproduisent en boucle (Friedl et Wolf, 2003).

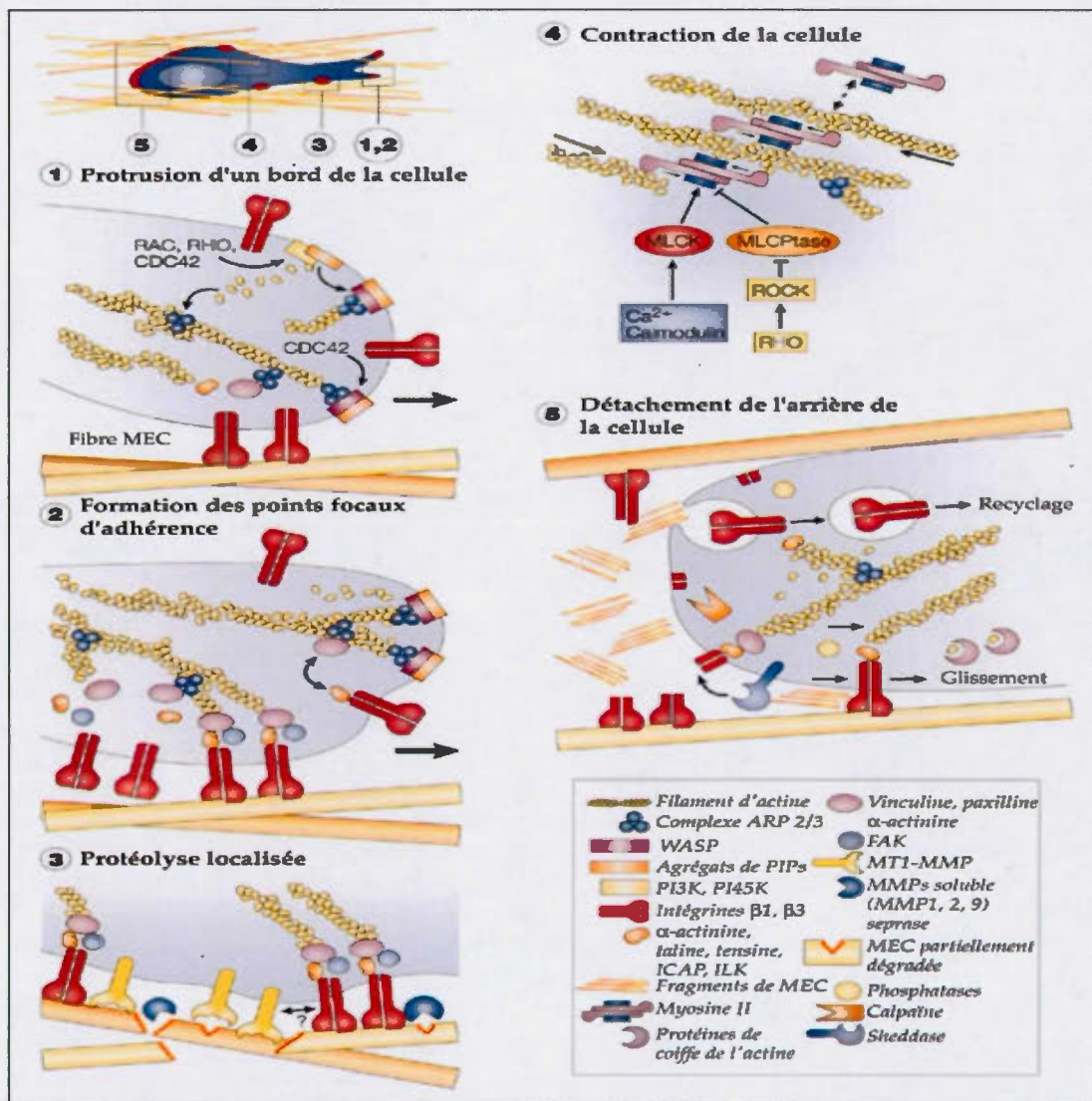


Figure 5 : Les étapes de la migration mésenchymateuse. La migration cellulaire mésenchymateuse est constituée de cinq étapes distinctes, soit la protrusion à une extrémité de la cellule, la formation des points focaux d'adhérence, la protéolyse localisée, la contraction de la cellule et finalement le détachement de l'arrière de la cellule.

[Adapté de : Friedl et Wolf, 2003]

1.3 Les métalloprotéinases de la matrice extracellulaire

1.3.1 La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) constitue le tissu conjonctif (Weber et Kyo, 2011). En effet, elle représente tout le matériel dans lequel baignent les cellules. La MEC est un assemblage complexe qui constitue différents types de macromolécules telles que les protéines de structure, les protéines d'adhésion et les polysaccharides, jouant un rôle crucial dans les interactions cellule-cellule et cellule-MEC (Weber et Kyo, 2011). La famille des collagènes représente la composante majeure de la MEC puisqu'elle joue un rôle de soutien et de résistance mécanique. Comme composants de la MEC, on retrouve également des glycoprotéines et des protéoglycanes. Ces macromolécules ont autant un rôle de soutien physique qu'un rôle biochimique de signalisation (Egeblad et Werb, 2002). La MEC contient, de plus, plusieurs facteurs et inhibiteurs de croissance, souvent liés aux différents collagènes. Les niveaux des molécules constituant la MEC peuvent avoir des conséquences dans différentes pathologies comme la sclérose en plaque, la maladie d'Alzheimer et le développement des cancers (Forget et al, 1999). De par sa grande diversité structurale, la MEC possède plusieurs fonctions. En effet, elle est continuellement renouvelée et subit des changements physiologiques au cours de phénomènes tels que la morphogenèse, l'angiogenèse, la cicatrisation et l'ossification (Vu et Werb, 2000). Étant donné que la MEC module le comportement dynamique des cellules, elle est constamment en restructuration par des protéases, notamment de la famille des MMPs (Muller et Fusenig, 2004).

1.3.2 Classification et structure

Les MMPs sont des endopeptidases capables de dégrader toute les composantes protéiques de la MEC. Actuellement, plus d'une vingtaine de MMPs sont connues et classées selon leurs différences structurales en six classes. La première classe des MMPs renferme les matrilysines (MMP-7 et MMP-26), elles se retrouvent au niveau des cellules cancéreuses épithéliales et ont la capacité de dégrader la gélatine ainsi que la fibronectine (Sterhlicht et Werb, 2001).

De cette façon, la MMP-7 est impliquée de façon cruciale au niveau de l'invasion et de la survie tumorale. Les collagénases (MMP-1, MMP-8 et MMP-13) constituent la deuxième classe des MMPs. Impliquées dans la dégradation des collagènes fibrillaires, soit les collagènes de type I à III, les collagénases sont responsables du remodelage et de la calcification des os (Sterhlicht et Werb, 2001).

La troisième classe présente les gélatinases A et B qui représentent respectivement la MMP-2 et la MMP-9. Celles-ci sont responsables de la dégradation de la gélatine et des collagènes de type IV et V de la membrane basale de la MEC. Les stromélysines (MMP-3, MMP-10 et MMP-11) forment la quatrième classe des MMPs, elles sont exprimées autant par les cellules saines que les cellules cancéreuses. Cette famille de MMPs est impliquée dans la dégradation de la MEC, plus précisément, dans la protéolyse des glycoprotéines et des peptidoglycanes. Il existe également la classe des MMPs membranaires MT1-MMP à MT6-MMP, aussi connus sous le nom de MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24 et MMP-25, respectivement. Ces MMPs sont ancrées dans la membrane plasmique via un domaine transmembranaire et ont un rôle important dans la dégradation des composantes de la MEC. Les MMPs membranaires peuvent être activées par des facteurs de croissance et peuvent, à leur

tour, activer d'autres MMPs. Ainsi, la MMP-14, ayant un rôle dans l'angiogenèse, est responsable de l'activation de la proMMP-2, une forme latente de la MMP-2.

En effet, les MMPs sont synthétisées sous forme de zymogènes, proMMPs, avant d'être activées en réponse à différents stimuli dans la MEC (Nagase et al, 2006). Les MMP-2 et MMP-9 sont impliquées dans l'ostéogenèse et dans la perméabilisation de la barrière hématoencéphalique, respectivement (Demeule et al, 2004). La sixième classe des MMPs présente des formes hétérogènes, elle comprend les MMP-12, -18, -19, -20, -21, -23, -27, et -28. Par exemple, la MMP-12 est une métallo-élastase, c'est-à-dire qu'elle dégrade l'élastine, sécrétée par les macrophages dont elle contrôle la migration (Hautamaki et al, 1997). De plus, la MMP-20 est responsable de l'hydrolyse de l'amélogénine conduisant à des produits de clivages spécifiques pour l'auto-assemblage de la matrice amélaire (Khan et al, 2013). La MMP-21 est impliquée dans l'embryogenèse et l'organogenèse chez la souris, en particulier dans les cellules nerveuses (Marchenko et al, 2003). Finalement, la MMP-28, est exprimée principalement dans les kératinocytes et joue un rôle dans l'homéostasie des tissus et dans la réparation des plaies (Visse et Nagase, 2003).

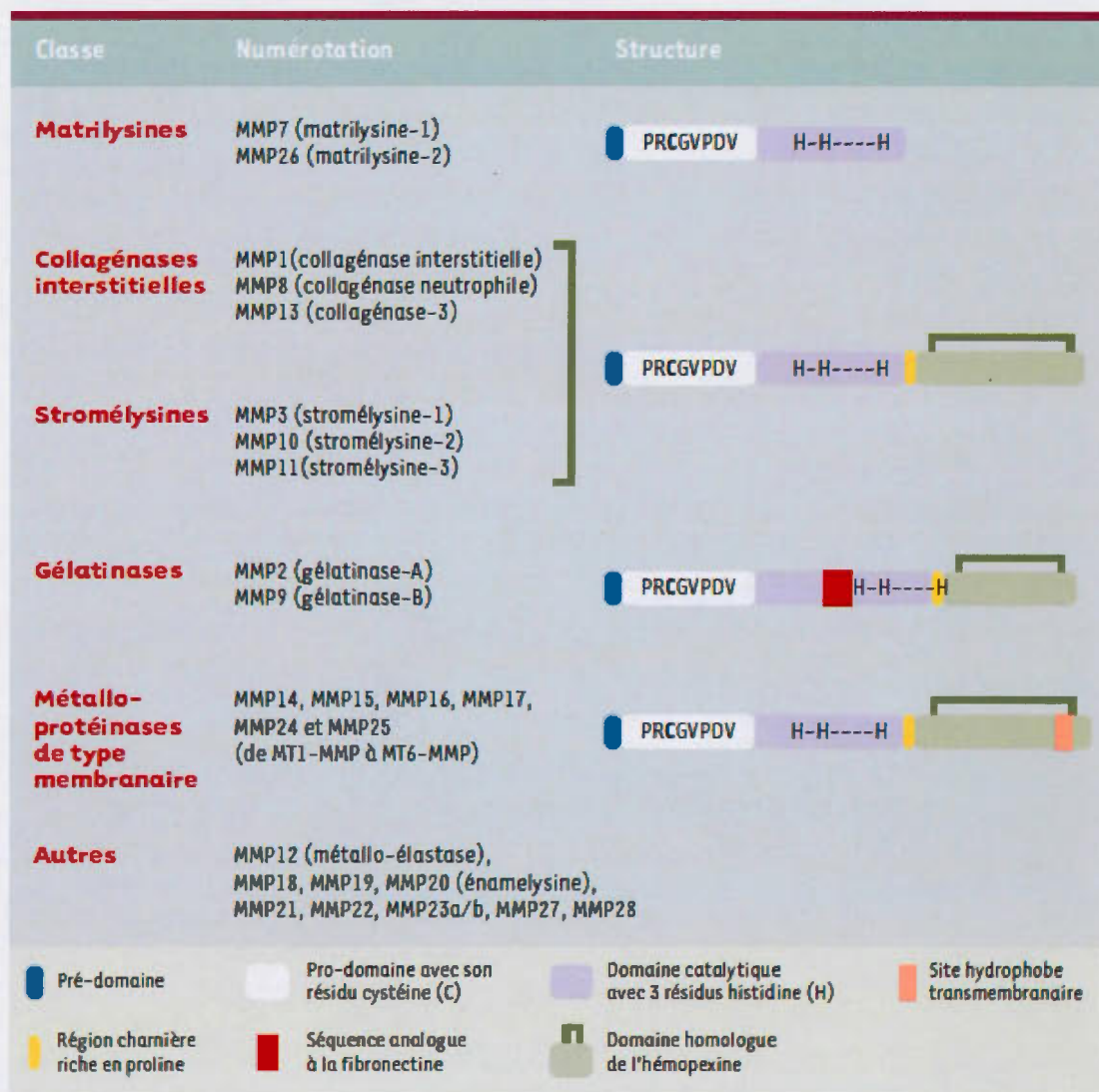


Figure 6 : Classification des MMPs. Les métalloprotéinases matricielles sont classées en six sous classes, les matrilysines, les collagénases interstitielles, les stromélysines, les gélatinases, les métalloprotéinases de type membranaire et un groupe hétérogène.

[Adapté de : Chantrain et DeClerck, 2002]

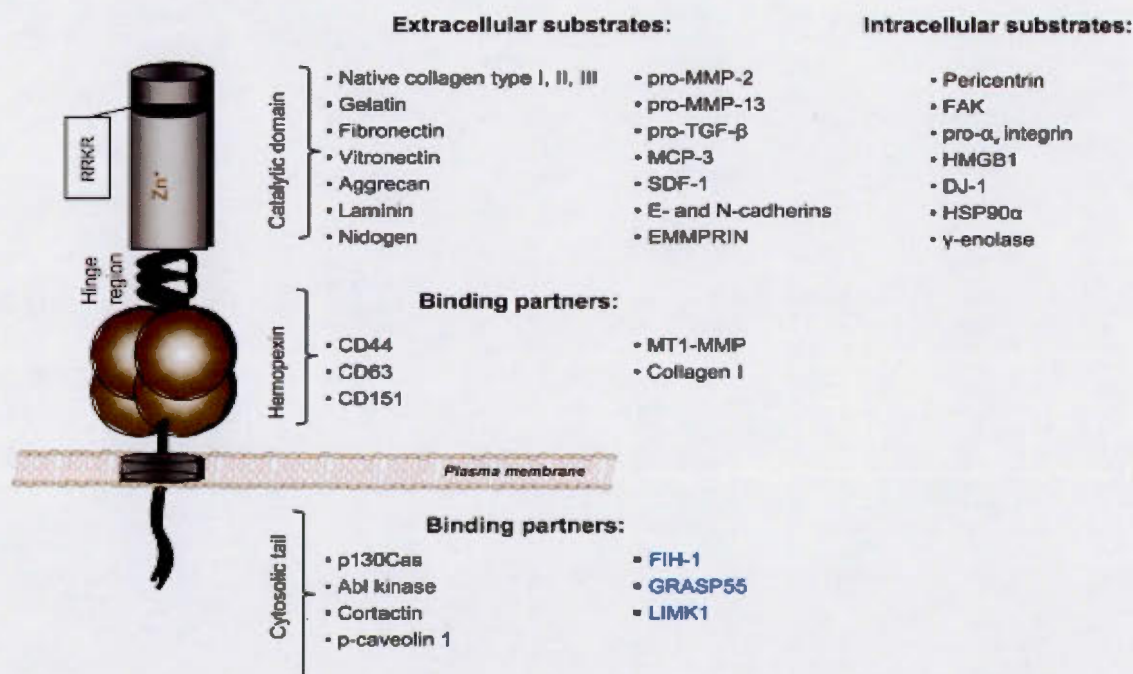


Figure 7 : Structure de la MT1-MMP. La MT1-MMP possède différents domaines avec des rôles spécifiques. La région catalytique est impliquée dans la dégradation de divers substrats extracellulaires, la région hémopexine possède des domaines de liaison pour diverses molécules dont des MT1-MMP permettant l'oligomérisation. Le domaine cytosolique est impliqué dans plusieurs cascades de signalisation intracellulaire.

[Adapté de : Koziol et al, 2012]

Les MMPs sont constituées d'un peptide signal et de 4 différents domaines, soit le pro-domaine-N-terminal, le domaine catalytique, la région charnière (*hinge*) et le domaine homologue C-terminal de l'hémopexine. Une portion transmembranaire se retrouve dans les MMPs membranaires (MT-MMP) (Koziol et al, 2012). Le pro-domaine est responsable du maintien de la forme inactive des MMPs. L'activation des MMPs nécessite donc le clivage de la portion pro-domaine par des protéases

telles que la furine, les protéases à sérine et d'autres MMPs (Sterhlicht et Werb, 2001).

Le domaine catalytique est responsable d'effectuer les fonctions hydrolytiques des MMPs. Au niveau de la MMP-2 et de la MMP-9, ce domaine est responsable de la spécificité à dégrader la gélatine (Visse et Nagase, 2003). Le domaine de l'hémopexine se retrouve au niveau de toutes les MMPs sauf MMP-7 et MMP-26. Ce dernier est responsable de la liaison aux substrats ainsi qu'aux inhibiteurs spécifiques (TIMPs) des MMPs.

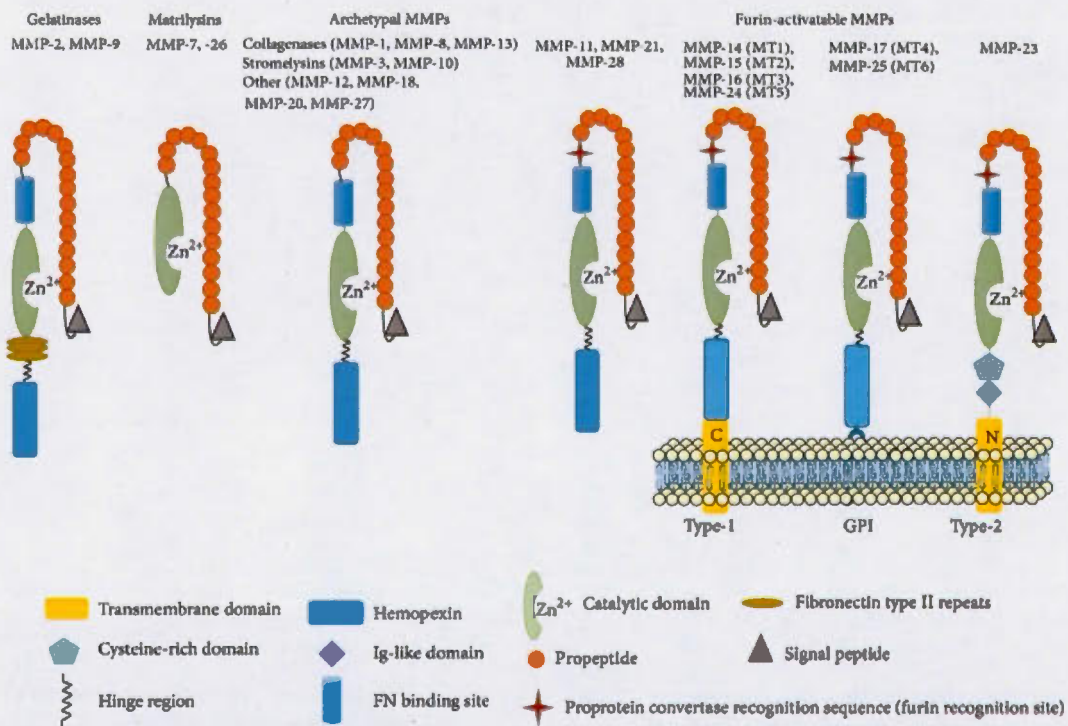


Figure 8 : Classification des MMPs en fonction de leurs différences structurales. La structure typique des MMPs est constituée d'un peptide signal, un pro-peptide, un domaine catalytique, la région de charnière, et un domaine hémopexine.

[Adapté de : Brkic, et al, 2015]

1.3.3 Les fonctions de la MT1-MMP

L'implication des MMPs dans le remodelage de la MEC et dans la dégradation de ses composantes est très documentée. Ainsi, elles jouent un rôle crucial dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques (Sterhlicht et Werb, 2001). La MT1-MMP est une métalloprotéinase membranaire collagénolytique composée de plusieurs domaines nécessaires pour ses multiples fonctions cellulaires. Elle possède un pro-domaine responsable de la maintenir dans une forme latente inactive. L'activation de la MT1-MMP requiert le clivage de la portion pro-domaine par des protéases telle que la furine (Sterhlicht et Werb, 2001). De plus, le domaine catalytique contient un site de liaison d'un ion Zn^{2+} essentiel à l'activation de la métalloprotéase. Ce même domaine active la proMMP-2 en MMP-2, ce qui contribue à la dégradation de la MEC via l'intermédiaire d'un complexe ternaire mettant en jeu MT1-MMP, TIMP-2 et la pro-MMP-2 (Sagi & Gaffney, 2015).

1.3.4 L'implication de la MT1-MMP dans la signalisation cellulaire

L'expression d'une grande partie des MMPs, notamment MMP-1, -3 et -9, n'est pas constitutive et est induite via des facteurs de croissance (EGF), des cytokines pro-inflammatoires ($TNF-\alpha$ et $IL-1-\beta$) et des esters de phorbol, entre autres (Birkedal-Hansen *et al.*, 1993). Parmi toutes les MMPs, le gène de la MT1-MMP est particulier puisqu'il est exprimé de façon constitutive par, entre autre, les fibroblastes, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses. La localisation de la MT1-MMP à la surface cellulaire est contrôlée par le phénomène d'endocytose permettant d'orienter les protéines membranaires d'une part vers les lysosomes pour être dégradées, d'autre part, vers les vésicules de sécrétion pour être recyclées au niveau

de la surface cellulaire (Conner et Schmid, 2003). La MT1-MMP contribue à la signalisation grâce à son domaine cytoplasmique qui rend possible la régulation de plusieurs fonctions cellulaires. Ce domaine cytoplasmique possède un rôle conséquent dans la migration cellulaire étant donné que sa suppression entraîne l'inhibition de la migration des macrophages, en dépit de son activité protéolytique (Sakamoto et Seiki, 2009). Les acides aminés suivants ; Leu⁵⁷¹⁻⁵⁷², Leu⁵⁷⁸⁻⁵⁷⁹ et la Tyr⁵⁷³ se retrouvent dans le domaine cytoplasmique et semblent responsables de la localisation de la MT1-MMP à la surface membranaire. Ainsi, une mutation au niveau de ces acides aminés affecte la localisation de la MT1-MMP sans pour autant perturber l'activité protéolytique (Uekita et al, 2001).

De nombreuses voies de signalisation intracellulaires sont déclenchées par le domaine cytoplasmique de la MT1-MMP. En effet, la MT1-MMP est impliquée dans l'activation des voies Rho A/ROK (Annabi et al, 2005), Ras/Mek/Erk (Gingras et Béliveau, 2010), RhoA/Rac-1 (Ando et al, 2011), Jak/Stat3 (Akla et al, 2012), ainsi que dans l'activation des processus inflammatoires, jusqu'à présent peu documentés.

1.3.5 L'implication de la MT1-MMP dans le développement tumoral

En plus de leur attribuer la capacité de dégrader la MEC favorisant l'invasion tumorale, les MMPs ont également une activité protéolytique dirigée envers les protéines non matricielles qui ont un rôle important dans le développement d'un cancer (Nelson et al, 2000). La perte d'adhérence cellulaire met en jeu certaines MMPs telles que les MMP-3 et -7. Celles-ci sont aussi impliquées dans la modification phénotypique des cellules épithéliales qui survient durant les premiers stades du développement tumoral. Effectivement, ces MMPs hydrolysent la cadhérine E afin de rompre les adhérences intercellulaires des épithéliums et solliciter

l'expression des promoteurs du cancer telle que la β -caténine (Lochter et al, 1997). La progression tumorale se poursuit par une invasion locale des cellules dans laquelle les gélatinases (MMP-2 et MMP-9), activées par MT1-MMP, ont une activité protéolytique sur les protéines de la membrane basale (Crawford, 1999). D'autres MMPs, comme les MMP-1 et MT1-MMP agissent sur les collagénases interstitielles présentes dans le tissu conjonctif entourant les cancers invasifs (Lochter et al, 1997). Une fois que les composantes de la MEC sont dégradées par la MT1-MMP et que les cellules endothéliales peuvent la traverser, la prolifération de ces cellules tumorales peut avoir lieu. Ceci est possible grâce à la libération des facteurs de croissance (bFGF, *basic fibroblast growth factor*) séquestrés dans la MEC ou complexés à des protéines porteuses (IGF, *insulin-like growth factor II*) et des cytokines (Martin et al, 1999 et Whitelock, 1996). Les MMPs sont également impliquées dans l'angiogenèse soit comme des stimulateurs ou des inhibiteurs. Les fonctions de la MT1-MMP s'exercent à plusieurs étapes de l'angiogenèse. Comme il a déjà été mentionné, outre son importance dans la dégradation de la MEC, la MT1-MMP exprimée par des cellules endothéliales en réponse à tout stimulus angiogénique, augmente la libération de facteurs angiogéniques tels que le VEGF (Bergers et al, 1999). Cependant, elle peut aussi avoir un effet négatif sur l'angiogenèse en libérant des facteurs anti-angiogéniques comme l'angiostatine, l'endostatine, et le plasminogène (Cornelius et al, 1998).

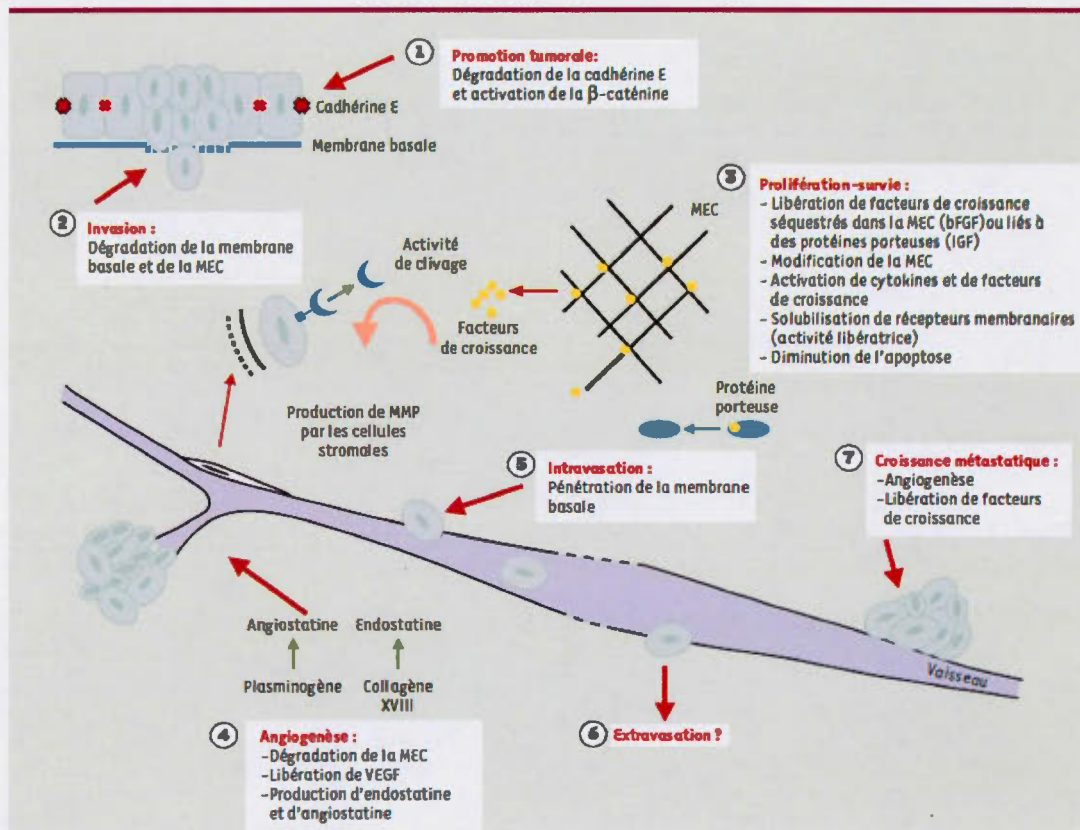


Figure 9 : Les rôles des MMPs au niveau de la progression tumorale. L'implication des métalloprotéinases matricielles est soulignée à chaque étape de la progression du cancer. 1. Promotion ; 2. Invasion ; 3. Prolifération-survie ; 4. Angiogenèse ; 5. Intravasation ; 6. Extravasation ; 7. Croissance métastatique.

[Adapté de : Chantrain et DeClerck, 2002]

1.3.6 Les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases

De nombreuses études ont précédemment démontré que la forme active de la MT1-MMP de 60kDa est clivée au niveau de la portion catalytique par la MMP-2 ou par la MT1-MMP elle-même, d'où résultent les formes de 44 à 45 kDa (Lehti *et al.*, 1998). En effet, l'existence d'une forme MT1-MMP déletée du domaine catalytique soutient l'hypothèse d'une régulation négative de cette protéase membranaire (Lehti *et al.*, 1998). L'inhibition des MMPs endogènes est contrôlée par des inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases (TIMPs) spécifiques et par les α_2 -macroglobulines (Sterhlicht et Werb, 2001). Tout d'abord, l' α_2 -macroglobuline est un inhibiteur endogène majeur des MMPs. Cette protéine plasmatique abondante représente le principal inhibiteur des MMPs dans les fluides tissulaires et dans le plasma, tandis que les TIMPs peuvent agir localement. De plus, puisque les complexes α_2 -macroglobuline/MMP sont éliminés via le mécanisme d'endocytose médiée par un récepteur, l' α_2 -macroglobuline joue un rôle important dans l'élimination irréversible des MMPs, alors que les TIMPs inhibent les MMP d'une manière réversible (Sterhlicht et Werb, 2001). Ensuite, la famille des TIMPs comprend 4 membres soit TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 et TIMP-4. La régulation transcriptionnelle, les propriétés biochimiques ainsi que la structure de chaque membre de ces inhibiteurs tissulaires se fait de façon distincte (Visse et Nagase, 2003). Les TIMPs ont la capacité d'inhiber les MMPs de manière spécifique. Les TIMP-1 et TIMP-2 se lient, respectivement, à la proMMP-9 et à la proMMP-2, via leur domaine C-terminal. En effet, la formation de complexes TIMP-1/MMP-9 et TIMP-2/MMP2 entraîne l'inhibition d'autres MMPs. TIMP-3 a la responsabilité d'inhiber spécifiquement l'activité des MMP-1, -2, -3, -9, et -13 alors que TIMP-4 est responsable d'inhiber les MMP-1, -2, -3, -7 et -9. Par conséquent, il est évident que la balance entre les MMPs et leurs inhibiteurs tissulaires, a un impact sur l'activité protéolytique de ces protéines ainsi que sur la dégradation de la MEC.

Cet équilibre MMPs/TIMPs est étroitement régulé, sans quoi l'apparition de certaines pathologies est inévitable.

Les TIMP-2 ont un profil particulier, puisqu'elles ne sont pas seulement inhibitrices de l'activité protéolytique. En effet, ces dernières participent à l'interaction de la MT1-MMP avec la proMMP-2 en formant le complexe trimoléculaire, essentiel à l'activation de MMP-2 via MT1-MMP. En plus d'avoir des activités inhibitrices de MMPs, les TIMPs ont des fonctions biologiques (Visse et Nagase, 2003). En effet, les TIMPs sont aussi impliquées au niveau de la neuro-protection, les activités pro-apoptotiques, la stimulation de la prolifération cellulaire, l'oncogenèse et la réparation tissulaire (Moore et Crocker, 2012).

Par ailleurs, il existe un autre inhibiteur endogène de la MT1-MMP, MMP-2 et MMP-9 connu sous le nom de RECK (*Reversion-inducing-Cystein rich protein with Kazal motifs*), une glycoprotéine ancrée dans la membrane via un groupement GPI (Takahashi *et al.*, 1998 et Oh *et al.*, 2001).

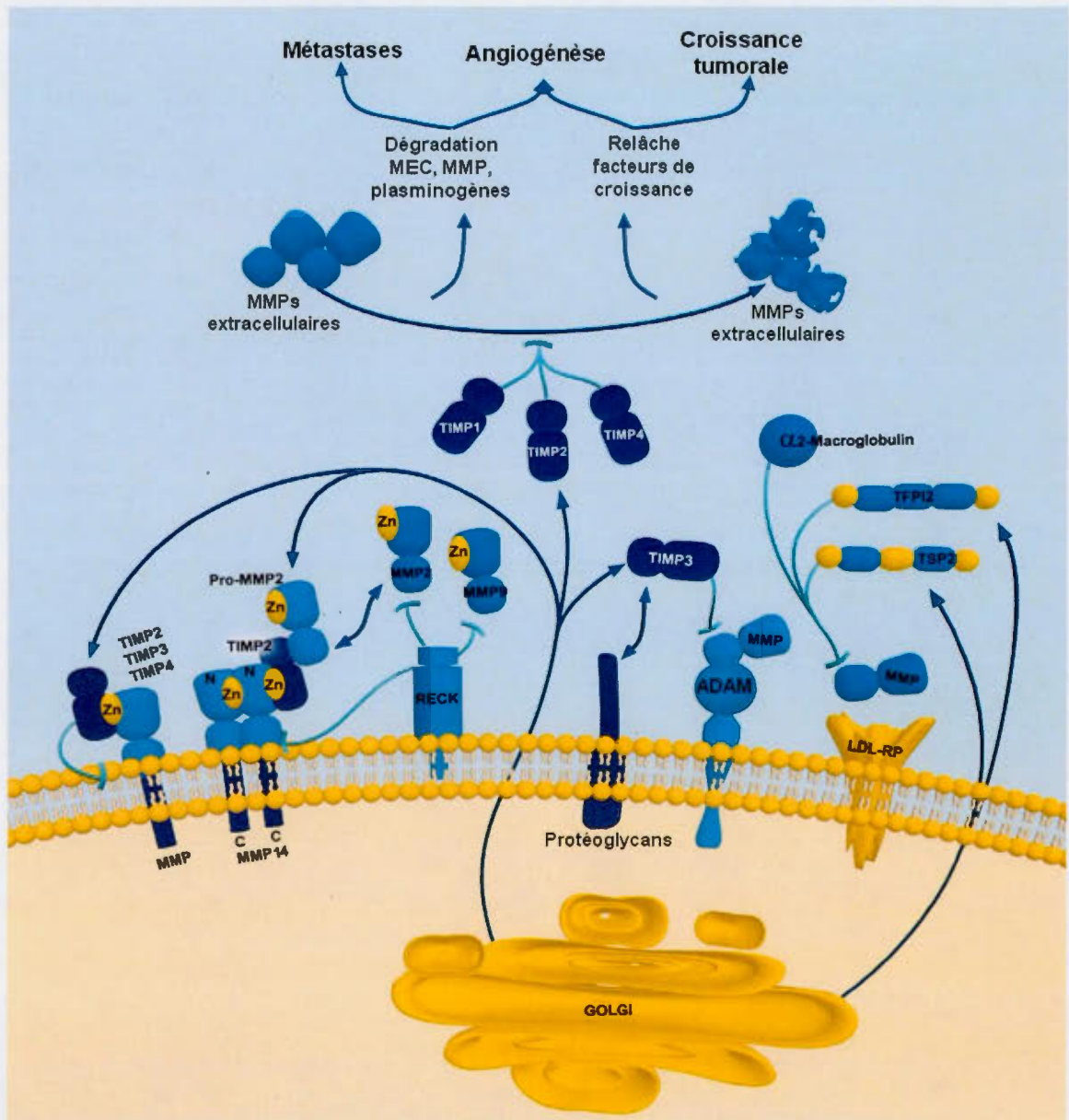


Figure 10 : Différents inhibiteurs tissulaires des MMPs impliqués au niveau de la progression tumorale.

Abréviation : MMPs : métalloprotéases matricielles; TIMPs : inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases; MEC : matrice extracellulaire; Zn : Zinc; MT-MMP : métalloprotéases de type membranaire; LDL-RP : Récepteur de lipoprotéines de faible densité.

[Adapté de : ABCAM, 2012]

L'implication de la MT1-MMP dans la progression tumorale en fait une cible thérapeutique idéale pour contrer le cancer. Dans cette perspective, des inhibiteurs synthétiques de la MT1-MMP ont été mis au point, depuis quelques années, afin qu'ils régissent des processus tels que l'angiogenèse tumorale. Les inhibiteurs synthétiques ont comme principale fonction la chélation de l'ion Zn^{2+} au niveau du site catalytique des MMPs de type membranaires. Cette fonction est possible grâce à la présence d'un acide hydroxamique, d'un acide carboxamique, d'un phosphoamide ou d'un groupement thiol que l'on retrouve dans la structure moléculaire des inhibiteurs tels que Batimastat (BB94), Marimastat (BB2516), Prinomastat (AG3340), Tanomastat (BAY 12-9566) et le Metastat (Tu *et al.*, 2008). Certains inhibiteurs synthétiques ont été développés de façon à ce qu'ils soient plus sélectifs dans leur mode d'action. Ces derniers ont engendré dans des modèles tumoraux primitifs des diminutions au niveau de l'angiogenèse et de la croissance tumorale. Toutefois, l'efficacité des traitements et les essais cliniques peu concluants témoignent de l'importance de mieux connaître les MMPs. Ainsi, le développement de nouveaux inhibiteurs synthétiques ciblant sélectivement MMP-2 et MMP-9, des MMPs impliquées dans l'étape initiale du cancer, pourrait s'avérer plus profitable.

1.3.7 Inhibition des MMPs par les polyphénols

Les polyphénols sont des molécules phytochimiques particulièrement connues pour leurs propriétés préventives contre le cancer (Béliveau et Gingras, 2014). Les polyphénols sont une famille de molécules très communes dans le règne végétal et sont situés dans les organes tels que les racines, la tige, la feuille, la fleur et le fruit. Ces molécules sont synthétisées par les végétaux comme métabolites secondaires impliqués dans leurs mécanismes de défenses, ils n'ont donc pas de fonctions directes dans les mécanismes de croissances et de production (Pandey et Rizvi, 2009). Les polyphénols sont regroupés en quatre catégories selon le nombre d'atome constitutifs et la structure de squelette de base, on y retrouve les acides phénoliques, les

flavonoïdes, les stilbènes et les lignanes. En ce qui concerne les flavonoïdes, ils sont subdivisés en six sous-classes soit les flavonols, les flavones, les isoflavones, les flavanones, les anthocyanes et les flavanols (Manach et al, 2004). Ces molécules font l'objet de plusieurs études cliniques, épidémiologiques et nutritionnelles pour leur capacité à améliorer la santé humaine. En effet, selon certaines études, les populations ayant une alimentation riche en polyphénols sont moins susceptibles à développer certains cancers (Liu et al, 2011).

Le thé vert est une boisson extrêmement répandue dans le monde. Issu des feuilles d'une plante, la *Camellia sinensis*, il contient plus de 700 produits chimiques dont les polyphénols (Liu et al, 2011). Ces polyphénols sont des molécules phytochimiques particulièrement connues pour leurs propriétés préventives contre le cancer (Béliveau et Gingras, 2005). L'épigallocatechines-3-gallate (EGCG) est la catéchine la plus abondante dans le thé vert. En effet, dans une tasse de thé infusé on retrouve environ 100 à 150 mg de catéchines dont 50% est de l'EGCG (Di Domenico et al, 2012).

Les catéchines comptent neuf membres, (-)- C (catéchine), (+)- C (catéchine), CG (catéchine-3-gallate;), GC (gallocatéchine), GCG (gallocatéchine-3-gallate), EC (épicatéchine), ECG (épicatéchine-3-gallate), EGC (épigallocatechicine) et EGCG (épigallocatechicine-3-gallate). Elles contiennent deux noyaux benzènes : A et B, qui portent plusieurs groupements hydroxyles liés par un noyau pyrène contenant un oxygène (Zaveri, 2006). La présence d'un hétérocycle (cycle C) ne présente ni de doubles liaisons ni deux atomes additionnels d'hydrogènes comparativement aux deux autres cycles. Par ailleurs, il existe des énantiomères dont une positive (+) liée au pouvoir antioxydant, et l'autre négative (-), qui induit l'oxydation et la mort cellulaire chez les végétaux.

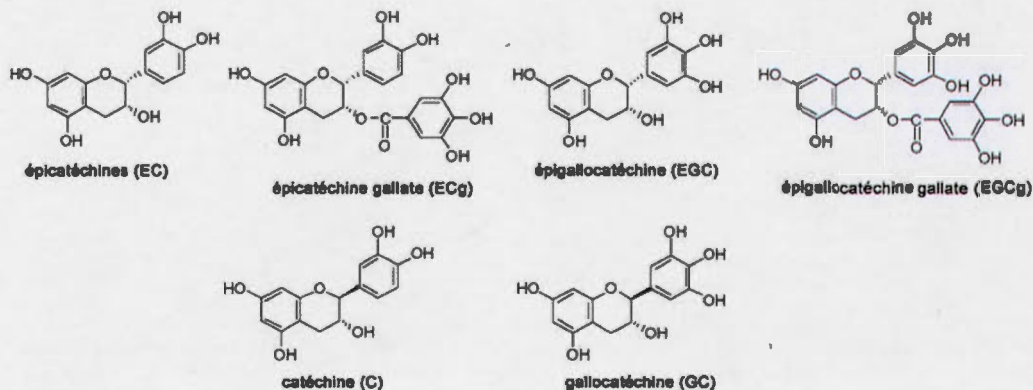


Figure 11 : La structure moléculaire des différentes catéchines contenues dans le thé vert.

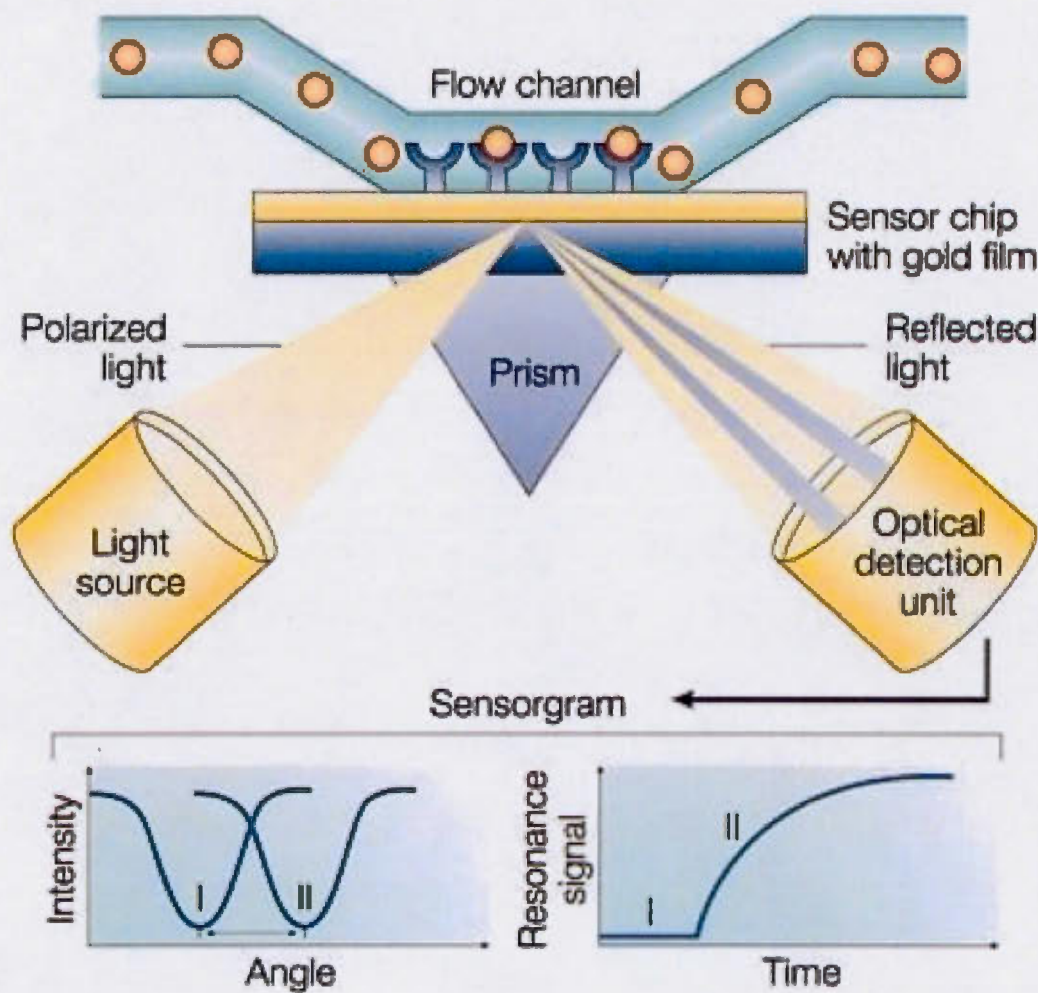
[Adapté de : Zaveri, 2006]

1.4 Méthode d'analyse expérimentale de l'interaction entre les catéchines et les complexes protéiques de MMPs : la résonance plasmonique de surface

La résonance plasmonique de surface est une méthode biophysique relativement nouvelle qui n'est répandue grâce au premier instrument commercial instauré par Biacore, en 1990 (Jönsson, et al, 1991). Depuis, il est devenu un outil puissant pour mesurer les interactions biomoléculaires en temps réel et ce dans un environnement acellulaire (Jönsson, et al, 1991). Cet instrument permet une étude fonctionnelle des interactions entre des facteurs intracellulaires qui couvrent une très large gamme de poids moléculaires, et renseigne sur leurs paramètres cinétiques (Jason-Moller, et al, 2006). Le principal avantage de cette technologie se résume à une analyse très rapide étant donné qu'elle se fait en temps réel, elle ne requiert pas l'utilisation de

marqueurs fluorescents ou radioactifs et possède une flexibilité du système très large puisqu'elle s'adapte à la détection de n'importe quel analyte (Jönsson, et al, 1991).

La résonance plasmonique de surface est un phénomène physique permettant de mesurer la liaison d'un ligand à un récepteur adsorbé à la surface d'une couche métallique souvent en or ou en argent (Zhang et al, 2015). Le système de détection repose sur une variation de l'indice de l'interface une fois que le ligand se complexe aux récepteurs. En effet, le changement de masse, à la surface, due à cette fixation va modifier l'angle de réflexion et ainsi entraîner une variation au niveau de l'indice de réfraction (Zhang et al, 2015). La résonance plasmonique de surface permet la caractérisation de multiples situations impliquant des interactions moléculaires. En effet, elle couvre des échantillons variés allant des protéines, des acides nucléiques, des glucides, des vésicules lipidiques, des virus, des bactéries et de petites molécules à des mélanges plus complexes (Zhang et al, 2015). L'utilisation de la résonance plasmonique de surface prend de l'expansion puisqu'elle est de plus en plus populaire dans le domaine de la découverte de nouveaux médicaments, dans le diagnostic clinique et dans la biochimie fondamentale telle que la recherche en oncologie (Zhang et al, 2015). La compréhension des interactions entre ces biomolécules au niveau moléculaire est indispensable pour le développement d'agents thérapeutiques hautement spécifiques (Zhang et al, 2015).



Nature Reviews | Drug Discovery

Figure 12 : Principe de résonance plasmonique de surface. Le SPR détecte les variations de l'indice de réfraction de la couche de surface d'une puce de capteur. Il s'agit d'une forte ombre à la lumière réfléchiée par la surface selon un angle qui dépend de la masse du matériau à la surface. Les changements d'angle SPR (de I à II dans le schéma en bas à gauche) se produisent lorsque des biomolécules se lient à la surface augmentant la masse de la couche de surface. Ce changement d'angle de résonance peut être contrôlé en temps réel comme un terrain de signal de résonance en fonction du temps.

CHAPITRE II

PROJET DE RECHERCHE

2.1 Problématique et hypothèse de travail

On croit que la majorité des effets biologiques du thé vert sont attribués à l'EGCG. Le gallate présent au niveau de sa structure lui confère un pouvoir antioxydant. Ce dernier lui permet l'inactivation des radicaux libres et la chélation de certains ions (Zaveri, 2006). En plus de son effet antioxydant, il a été démontré que l'EGCG est impliqué dans plusieurs mécanismes cellulaires ciblés dans le cancer, tels l'inhibition de la prolifération et l'induction de l'apoptose au sein des cellules tumorales.

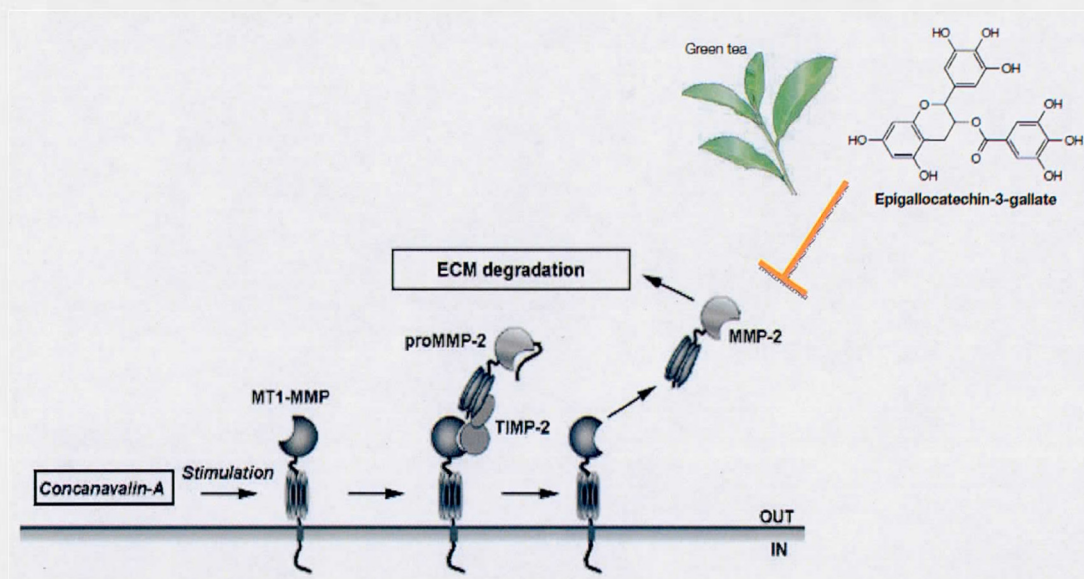
La dégradation de la MEC est assurée par l'activation de la proMMP2 qui se fait via l'interaction de son domaine C-terminal avec la MT1-MMP et TIMP2. Ce mécanisme est inhibé par une molécule phytochimique, l'EGCG. En effet, cette molécule fait l'objet de plusieurs études notamment celle où son implication a été démontrée dans l'inhibition de la dégradation de la MEC par les MMPs.

L'efficacité des autres catéchines à inhiber les MMPs, incluant MT1-MMP, est peu documentée. Dans le cadre de la présente étude nous nous interrogeons sur l'impact de toutes les molécules de la famille des catéchines sur les acteurs moléculaires formant le complexe trimoléculaire MT1-MMP/MMP2/TIMP2 responsable de la dégradation de la MEC. Il est reconnu que ce complexe trimoléculaire est important dans le mécanisme d'action de la MT1-MMP et que des inhibiteurs naturels des MMPs peuvent restreindre la dégradation de la MEC. Toutefois, le mode d'action de ces molécules naturelles demeure peu documenté.

Nous mettons l'hypothèse qu'une meilleure compréhension du mécanisme d'action pourrait éventuellement permettre le développement de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement des glioblastomes.

2.2 Objectifs de recherche

Les objectifs de ce projet consistent à élucider l'impact des catéchines sur l'induction de la MT1-MMP médiée par la concanavale A (conA), sur la capacité à inhiber l'activation de la proMMP2, essentielle à la dégradation de la MEC. Le dernier objectif est l'identification des interactions possibles entre les molécules de la famille des catéchines avec la MT1-MMP, elle-même, et certaines de ses partenaires (MMP-2, TIMP2, MTCBP, LRP1-Cluster IV) par la résonance plasmonique de surface (SPR).



Capacités d'inhibitions potentielles des MMPs par les différentes catéchines.
 Etant donné que l'inhibition de la MT1-MMP par l'EGCG à déjà été rapportée, il serait intéressant d'évaluer l'effet d'autres catéchines sur les MMPs.

CHAPITRE III

Evidence for green tea catechins molecular binding targets in MT1-MMP-mediated signalling and proteolytic functions

Djahida Djerir and Borhane Annabi

From the Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Centre de recherche BIOMED,
Département de Chimie, Université du Québec à Montréal, Quebec, Canada

Running title : Catechins regulate MT1-MMP functions

Correspondence should be directed to : Borhane Annabi, Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succ. Centre-ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3P8; Phone : (514) 987-3000 ext 7610; E-mail : annabi.borhane@uqam.ca

Keywords : Catechins, MT1-MMP, Surface plasmon resonance, Green tea

ABSTRACT

Membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) is a transmembrane MMP which triggers intracellular signal transduction and which regulates extracellular matrix proteolysis, two functions that are critical for tumor-associated inflammation and angiogenesis. While green tea catechins, particularly epigallocatechin gallate (EGCg), are considered very effective in the prevention of various cancers, lack of structure-function studies and evidence regarding their direct interactions with MT1-MMP-mediated biological activities remain. Here, we assessed the impact of four ungallated green tea-derived catechins along with their gallated analogs on MT1-MMP-mediated functions and molecular binding partners, both in cellular and acellular conditions. Concanavalin-A (ConA) was used to activate U87 glioblastoma cells and to trigger MT1-MMP-mediated proMMP-2 activation, MT1-MMP and endoplasmic reticulum stress biomarker GRP78 expression. We found that ConA-mediated MT1-MMP induction was inhibited by EGCg and catechin gallate (Cg), GRP78 induction was inhibited by EGCg, Cg, and gallocatechin gallate (GCg), whereas proMMP-2 activation was inhibited by EGCg and GCg. Surface plasmon resonance was used to assess any direct interactions between catechins and MT1-MMP interactors. We found that all four gallated catechins interacted better than their ungallated analogs with MT1-MMP as well as with MT1-MMP binding partners MMP-2, TIMP-2, MTCBP-1 and LRP1-clusterIV. Overall, this is the first structure-function evidence supporting a role for the galloyl

moiety in both direct and indirect interactions of green tea catechins with MT1-MMP-mediated oncogenic processes.

INTRODUCTION

The use of various natural phytochemicals and dietary compounds in cancer chemoprevention is believed to prevent the onset of pathophysiological processes which regulate tumor growth (Kotecha et al., 2016). Epidemiological and pre-clinical data, obtained through *in vitro* and *in vivo* animal studies, support the concept that these compounds can modulate oncogenic signaling pathways or sensitize malignant cells to cytotoxic agents (Kazi et al., 2002). Unfortunately, only a limited number of these compounds have been tested in clinical trials often because of the lack of structure-function molecular evidence supporting their capacity to interact with their cellular targets and interfere with the associated biological processes (Maru et al., 2016).

Besides several other polyphenolic compounds, the prophylactic and therapeutic properties of tea have been attributed to green tea catechins and black tea theaflavins (Darvesh and Bishayee, 2013). Whereas among natural compounds and traditional Chinese medicines, tea polyphenols possess potent antioxidant and anti-inflammatory properties which modulate several signaling pathways (Rahmani et al., 2015), epigallocatechin gallate (EGCg) is one of the most studied active substances and considered to act through diversified molecular mechanisms (Peter et al., 2016). Its *in vitro* cellular effects were documented in numerous central nervous system (CNS) cancer cell models including glioblastoma (Annabi et al., 2002; Annabi et al.,

2005; Penaranda et al., 2016), pediatric brain tumor-derived medulloblastoma (Pilorget et al., 2003), and in childhood primitive neuroectodermal brain tumors (Didiano et al., 2004). Interestingly, EGCg combination with Temozolomide (Chen et al., 2011), or with ionizing radiation (McLaughlin et al., 2006; Lecumberri et al., 2013) was found to contribute to enhanced therapeutic efficacy. Among the molecular processes targeted by EGCg, these include inhibition of cell proliferation, survival, *in vitro* endothelial cell tubulogenesis, pro-inflammatory intracellular transducing events, as well as cell migration/invasion processes (Benelli et al., 2002). In addition, EGCg was recently documented to alter the membrane bound matrix metalloproteinase MT1-MMP functions in cancer cell invasion and survival processes through the inhibition of its capacity to hydrolyze extracellular matrix (ECM) components (Oku et al., 2003), to activate latent proMMP (Dell'Aica et al., 2002), and to signal pro-angiogenic and pro-inflammatory intracellular events involving Erk, RhoA/ROK, Src or JAK/STAT3 pathways (Maeda-Yamamoto et al., 2003; Annabi et al., 2005; Zgheib et al., 2013).

While evidence suggests that the effects of EGCg are, in part, mediated through its specific interaction with the 67 kDa laminin receptor (67LR) (Tachibana et al., 2004), the molecular mechanism of action of most of the other catechins remains unknown. Interestingly, the role of 67LR has led to the conclusion that catechin (C), epicatechin (EC), and epigallocatechin (EGC) were unable to bind to the 67LR (Tachibana et al., 2004). Unfortunately, much less information was

provided with regards to the gallated catechins. It is yet unknown whether EGCg's alternate structural analogs, that also contain the galloyl moiety, bind to the same EGCg receptor. Initial structure-function studies have suggested galloyl moiety of catechins to inhibit phorbol ester-induced MMP-9 and HuR expressions (Annabi et al., 2007), as well as to dictate fatty-acid synthase inhibition (Wang et al., 2003). Whether any of these catechins directly bind and interact with MT1-MMP itself or interactors of MT1-MMP has however yet to be documented.

In the current study, we used surface plasmon resonance (SPR) and compared the potential direct interaction of four ungallated green tea-derived catechins to their gallated equivalents towards either MT1-MMP or to several predicted interactors such as matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2, MT1-MMP cytoplasmic tail-binding protein-1 (MTCBP-1), or low-density-lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1). Structure-function cellular assays were also performed to address MT1-MMP-dependent processes involved in proMMP-2 activation and in GRP78 induction upon ConA-activated U87 glioblastoma cells.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials : Sodium dodecylsulfate (SDS) and bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma (Oakville, ON). Cell culture media was obtained from Invitrogen (Burlington, ON). Electrophoresis reagents were purchased from Bio-Rad (Mississauga, ON). The enhanced chemiluminescence (ECL) reagents were from Amersham Pharmacia Biotech (Baie d'Urfé, QC). Micro bicinchoninic acid protein assay reagents were from Pierce (Rockford, IL). The monoclonal antibody against GRP78 was from New England Biolabs (Pickering, ON). The polyclonal antibody against MT1-MMP was from Chemicon (Temecula, CA). Horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit and anti-mouse IgG secondary antibodies were from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA). All other reagents were from Sigma-Aldrich Canada.

Cell culture : The human U87 glioblastoma cell line was purchased from American Type Culture Collection (Manassas, VA) and maintained in Eagle's Minimum Essential Medium containing 10% (v/v) calf serum (HyClone Laboratories, Logan, UT), 1 mM sodium pyruvate, 2 mM glutamine, 100 units/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin. Cells were incubated at 37°C with 95% air and 5% CO₂.

Immunoblotting procedures : Cells were lysed in a buffer containing 1 mM each of NaF and Na₃VO₄, and proteins from control and treated cells were separated by

SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). After electrophoresis, proteins were electrotransferred to polyvinylidene difluoride membranes which were then blocked for 1 hour at room temperature with 5% non-fat dry milk in Tris-buffered saline (150 mM NaCl, 20 mM Tris–HCl, pH 7.5) containing 0.1% Tween-20 (TBST). Membranes were further washed in TBST and incubated with primary antibodies (1/1,000 dilution) in TBST containing 3% BSA and 0.05% NaN₃. The primary antibody was removed by washing with TBST, followed by a 1 hour incubation with horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (1/5,000 dilution) in TBST containing 5% non-fat dry milk. Immunoreactive material was visualized by enhanced chemiluminescence (Amersham Biosciences, Baie d’Urfé, QC).

Gelatin zymography : Gelatin zymography was used to assess the extent of proMMP-2 gelatinolytic activity and activation status as previously described (Sina et al., 2009). Briefly, an aliquot (20 µl) of the culture medium was subjected to SDS-PAGE in a gel containing 0.1 mg/ml gelatin, a substrate that is efficiently hydrolyzed by proMMP-2 and MMP-2. The gels were then incubated in 2.5% Triton X-100 and rinsed in nanopure distilled H₂O. Gels were further incubated at 37°C for 20 hrs in 20 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 0.02% Brij-35, 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.6, then stained with 0.1% Coomassie Brilliant blue R-250 and destained in 10% acetic acid, 30% methanol in H₂O. Gelatinolytic activity was detected as unstained bands on a blue background.

Surface plasmon resonance (SPR) analysis : SPR analyses were performed using a Biacore T200 instrument (GE Healthcare). LRP-cluster IV, TIMP-2, MMP-2, MT1-MMP, and MTCBP-1 recombinant proteins (Fitzgerald industries international, Acton, MA) were immobilized on a carboxymethylated dextran CM5 sensor chip (GE Healthcare) using an amine-coupling strategy. Briefly, the sensor chip surface was activated with a 1:1 mixture of N-hydroxysuccinimide and 3-(N,Ndimethylamino)-propyl-N-ethylcarbodiimide. Recombinant protein solutions (20 µg/mL) were injected at a flow rate of 10 µL/min using HBS-N running buffer (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.4) to reach a level of immobilization of 400 RU. Surfaces (protein and reference) were blocked by the injection of an ethanolamine solution. Binding kinetics of catechins over the immobilized recombinant proteins sensor chip was evaluated in HBS-N buffer at increased concentrations (6.25 to 100 µM) at a flow rate of 20 µL/min. The sensor chip was regenerated by injecting 20 µL of a 10 mM glycine solution, pH 3. Binding sensograms were obtained by subtraction of the reference flow cell. Experiments were performed in duplicate and data analysis was performed using the BIAevaluation software package (GE Healthcare).

Statistical data analysis : Data are representative of three or more independent experiments. Statistical significance was assessed using GraphPad Prism 5 software with Student's paired t-test. * $P < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

MT1-MMP interactors and structure of several green tea-derived catechins. MT1-MMP possesses extracellular hydrolytic activities as well as intracellular cell transducing functions in brain tumorigenesis (Ulasov et al., 2014). Among the principal extracellular interactors predicted, MT1-MMP, proMMP-2 (MMP-2) and TIMP-2 are well known to contribute to the formation of the ternary complex required for optimal processing of latent inactive proMMP-2 into active MMP-2 (Sharabi et al., 2013) (Fig.1A). TIMP-1 was also documented to weakly interact with MT1-MMP (Brew and Nagase, 2010; Ries, 2014). The cell surface low density lipoprotein-related protein 1 (LRP1), as well as the intracellular partners Furin and MTCBP-1 are believed to interact with the cytoplasmic domain of MT1-MMP, which interaction could possibly modulate MT1-MMP's signal transducing functions (Strongin, 2010) (Fig.1A). In order to document the possible structure-function interactions of catechins with any of these interactors, the structure of four ungallated catechins (Fig.1B) as well as of four gallated equivalent catechins (Fig.1C) were tested.

Impact of catechins on Concanavalin-A-induced expression of MT1-MMP and GRP78, and on the activation of proMMP-2 in U87 glioblastoma cells. Despite the evidence suggesting green tea catechins possess chemopreventive and anti-inflammatory properties (Ravishankar et al., 2013), structure-function studies remain

scarce. We decided to treat serum-starved U87 glioblastoma cells with Concanavalin-A (ConA), a well-known *in vitro* inducer of MT1-MMP (Annabi et al., 2001; Sina et al., 2010; Fig.2A) as well as of inflammation (Akla et al., 2012; Desjarlais et al., 2014) and autophagy (Pratt et al., 2012; Yau et al., 2015), in the presence or absence of eight different catechins. We found that among all compounds tested, EGCg and Cg were the only two potent catechins to inhibit ConA-mediated induction of MT1-MMP (Fig.2B). A slight non-statistically significant inhibitory effect (12-15%) was also observed with GCg and ECg (Fig.2B). When ConA-mediated induction of the inflammation and endoplasmic reticulum stress biomarker GRP78 expression was monitored (Fig.3A), we found that EGCg, GCg, and Cg were the most potent inhibitory catechins (Fig.3B). Finally, we further decided to monitor the impact of catechins upon ConA-mediated proMMP-2 activation (Fig.4A), a process believed to require the formation of a ternary MT1-MMP/TIMP-2/proMMP-2 complex (Holmbeck et al., 2004). We found that EGCg, ECg and GCg were the most efficient catechins to prevent proMMP-2 activation as assessed by zymography of the respective condition media harvested (Fig.4B). Collectively, we conclude that multiple of the catechins bearing the galloyl moiety can efficiently alter either ConA-mediated intracellular signaling that regulates MT1-MMP and GRP78 expression, or MT1-MMP-mediated activation of proMMP-2 within the extracellular compartment of U87 glioblastoma cells. Whether any of these catechins could directly bind to MT1-MMP interactors was next assessed.

Direct interaction assessment by SPR between MT1-MMP interactors and catechins. In order to address the molecular mechanism of action of catechins, we hypothesized that they can directly target some of the MT1-MMP interactors. Thus, through SPR biosensor technology, we first addressed catechin binding to immobilized MT1-MMP. Representative sensograms show that none of the tested native catechins which lack the galloyl moiety demonstrated any interaction with MT1-MMP (Fig.5). Whereas, those four gallated catechins significantly interacted with MT1-MMP, with EGCg showing the highest affinity among them. When catechins binding was evaluated onto immobilized MMP-2 (Fig.6) or onto immobilized TIMP-2 (Fig.7), we observed that gallated catechins again targeted significantly those MT1-MMP interactors that contribute to the formation of the ternary complex. Interestingly, MTCBP-1 was also found to significantly be targeted by gallated catechins (Fig.8). Collectively, these observations suggest that potential hierarchical catechin binding processes could potentiate the combined actions of those gallated catechins. Whether, their binding interferes sequentially with either of these interactors during the formation of the ternary complex remains to be determined.

DISCUSSION

In this study, we highlight for the first time the potential direct binding capacities of green tea-derived catechins to MT1-MMP and to MT1-MMP interactors. Our study further emphasizes on the importance of the galloyl moiety which impacts the *in vitro* interaction capabilities of catechins towards MT1-MMP-mediated proMMP-2 activation process in a brain tumor cell model. Furthermore, we have been able to rank catechins according to their structures and binding affinities (Fig.10A) towards MT1-MMP and MT1-MMP interactors (Fig.10B). Such affinity ranking suggests a hierarchical targeting from the catechins tested and further confirms their potential synergistic and pleiotropic anti-cancer capabilities.

Aside from its canonical role in extracellular matrix (ECM) proteolysis, MT1-MMP is also involved in transducing crucial intracellular signalling that may control several processes related to cell mobilisation and survival (Annabi et al., 2003; Meriane et al., 2006; Annabi et al., 2004). Recently, it was demonstrate that, as a consequence of ConA activation, sequential Src kinase and JAK/STAT3 signalling were required to upregulate CSF-2 and CSF-3 transcription, and that this necessitated the contribution of MT1-MMP transduction through the crucial involvement of its phosphorylable Tyr573 residue located within its 20-amino acid cytoplasmic domain (Zgheib et al., 2013). In that study, the antiangiogenic, EGCG was able to abrogate

both ConA- and MT1-MMP-induced JAK/STAT signalling, which effect adds-up to current known EGCG's pleiotropic chemopreventive properties.

Since its discovery, MT1-MMP has been extensively investigated and is now among the best characterized MMPs. MT1-MMP has been implicated in various physiological and pathological processes such as wound healing, bone development, angiogenesis, inflammation, cancer invasion and metastasis (Beauvois, 2004), all of which also involve the recruitment of circulating bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (Abarategi et al., 2011). Although MT1-MMP primarily functions immediately outside the cell surface, where it modifies the environment of the cell (Moss et al., 2009), it is now suggested that alteration of signalling driven from the ECM adhesion molecules or in response to chemokines can be transduced by MT1-MMP, thereby influencing cellular functions (Gonzalo et al., 2010). Given its capacity to interact with extracellular components that impact on intracellular functions, a plausible mechanism may, upon extracellular complexation of MMP-2/TIMP-2/MT1-MMP, trigger a potential conformational change in MT1-MMP structure that would impact on its ability to relay intracellular signals. To validate such an audacious hypothesis, one would need a complex structure-to-function study with MT1-MMP deletion mutants within its catalytic, hemopexin, and hinge domains all believed to recognize, anchor, and catalyze proMMP to MMP activation.

Our current study also sheds light on the emerging importance of cell surface modulators such as the naturally-occurring plant lectin Concanavalin-A (ConA). Such lectin is used by the pharmaceutical industry as part of reliable *in vitro* cell functional assays for studying biological systems ranging from mitogenicity to pro-inflammatory cytokine production (Kanellopoulos et al., 1985; Ferriz-Martinez et al., 2010). Given the recent use of the lectin ConA, a potent Toll-Like receptors TLR-2 and TLR-6 agonist (Zgheib et al., 2013), our study further supports the potential targeting of green tea catechins towards existing crosstalk between TLRs and cancer (Goutagny et al., 2012), angiogenesis (Grote et al., 2011) and inflammation (Kong and Lee, 2011). Interestingly, ConA is well documented as also inducing MT1-MMP, the expression of which has also been documented in all the above regulated processes, similar to TLR involvement (Strongin, 2010; Arroyo et al., 2007). Our current cellular and acellular approaches imply that EGCG inhibits both ConA- and MT1-MMP-mediated signalling. In support of this, EGCG was already described as inhibiting TLR-2 and TLR-4 signaling (Byun et al., 2011; Byun et al., 2012), as well as the signaling that leads to diminished MT1-MMP gene expression (Annabi et al., 2002)), and that alter signaling cascades that lead to Src and STAT3 phosphorylation (Eisenach et al., 2010; Zgheib et al., 2013). Besides its impact on cancer progression and angiogenesis, catechins-mediated inhibition of MT1-MMP-regulated transcriptional regulation of genes seems to also be among the functions of catechins that may also impact on the expression of biomarkers in autophagy (37) as well as in neuroinflammation (38).

In conclusion, provided the IC₅₀ values of EGCG we report in this study closely approximate the reported plasmatic concentrations of ~1 μ M (Yang et al., 1998; Umegaki et al., 2001), with optimal pharmacological effects achieved at 30 μ M, our study puts emphasis on potential strategies aimed at targeting proangiogenic and immunomodulatory functions of brain tumor cells, thereby preventing their invasive phenotype. We provide the first molecular evidence that one such strategy therefore makes use of the chemopreventive properties of diet-derived polyphenols such as EGCG that may act through pharmacological targeting of the MT1-MMP extracellular and intracellular signaling.

Furthermore, we specifically investigated the *in vitro* targeting efficacy of the chemopreventive and dietary-derived EGCG molecule on the NF- κ B-mediated transcriptional regulation of a panel of 89 biomarkers associated with promyelocytic HL-60 differentiation into macrophages. NF- κ B-mediated signalling during HL-60 macrophage differentiation was reversed by EGCG, in part through reduced I κ B phosphorylation, and led to the inhibition of moderately-to-highly expressed NF- κ B gene targets among which the matrix metalloproteinase (MMP)-9 and the cyclooxygenase (COX)-2 (Vezina et al., 2012). In contrast, EGCG exhibited low efficacy in reversing NF- κ B-regulated genes and showed selective antagonism towards COX-2 expression while that of MMP-9 remained high in terminally-differentiated macrophages. Decreased expression of the 67 kDa non-integrin

Laminin Receptor in terminally-differentiated macrophages may explain such differential EGCG efficacy. Interestingly, green tea catechins containing a galloyl group in the 3' position have also been shown to inhibit tissue factor-induced thrombin generation (Cabrini et al., 2010), and to differentially regulate platelet aggregation (Bamborough et al., 2010). Noteworthy, whether the 67-kDa laminin receptor (67LR), which was in fact found to be the EGCG cell surface receptor (Chen, 2011), provides the specificity and transduces the effects of the other catechins containing the galloyl group in the 3' position remains to be confirmed. In light of our results, it is however tempting to hypothesize that the interaction between the galloyl groups in the 3' position of catechins with the cell surface 67LR would be responsible for the specific downstream signaling.

ACKNOWLEDGEMENTS

BA holds an institutional Research Chair in Cancer Prevention and Treatment.

This study was supported through funding by the Fondation UQAM.

REFERENCES

- Sina A, Lord-Dufour S, Annabi B. Cell-based evidence for aminopeptidase N/CD13 inhibitor actinonin targeting of MT1-MMP-mediated proMMP-2 activation. *Cancer Lett.* 2009 Jul 8;279(2):171-6.
- Annabi B, Currie JC, Moghrabi A, Béliveau R. Inhibition of HuR and MMP-9 expression in macrophage-differentiated HL-60 myeloid leukemia cells by green tea polyphenol EGCG. *Leuk Res.* 2007 Sep;31(9):1277-84.
- Tachibana H, Koga K, Fujimura Y, Yamada K. A receptor for green tea polyphenol EGCG. *Nat Struct Mol Biol.* 2004 Apr;11(4):380-1
- Maeda-Yamamoto M, Suzuki N, Sawai Y, Miyase T, Sano M, Hashimoto-Ohta A, Isemura M. Association of suppression of extracellular signal-regulated kinase phosphorylation by epigallocatechin gallate with the reduction of matrix metalloproteinase activities in human fibrosarcoma HT1080 cells. *J Agric Food Chem.* 2003 Mar 26;51(7):1858-63.
- Zgheib A, Lamy S, Annabi B. Epigallocatechin gallate targeting of membrane type 1 matrix metalloproteinase-mediated Src and Janus kinase/signal transducers and activators of transcription 3 signaling inhibits transcription of colony-

stimulating factors 2 and 3 in mesenchymal stromal cells. *J Biol Chem*. 2013 May 10;288(19):13378-86

Dell'Aica I, Donà M, Sartor L, Pezzato E, Garbisa S. (-)Epigallocatechin-3-gallate directly inhibits MT1-MMP activity, leading to accumulation of nonactivated MMP-2 at the cell surface. *Lab Invest*. 2002 Dec;82(12):1685-93

Oku N, Matsukawa M, Yamakawa S, Asai T, Yahara S, Hashimoto F, Akizawa T. Inhibitory effect of green tea polyphenols on membrane-type 1 matrix metalloproteinase, MT1-MMP. *Biol Pharm Bull*. 2003 Sep;26(9):1235-8.

Annabi B, Lachambre MP, Bousquet-Gagnon N, Page M, Gingras D, Beliveau R. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin 3-gallate inhibits MMP-2 secretion and MT1-MMP-driven migration in glioblastoma cells. *Biochim Biophys Acta*. 2002 Jan 30;1542(1-3):209-20.

Annabi B, Bouzeghrane M, Moumdjian R, Moghrabi A, Béliveau R. Probing the infiltrating character of brain tumors: inhibition of RhoA/ROK-mediated CD44 cell surface shedding from glioma cells by the green tea catechin EGCg. *J Neurochem*. 2005 Aug;94(4):906-16.

Peñaranda Fajardo NM, Meijer C, Krut FA. The endoplasmic reticulum stress/unfolded protein response in gliomagenesis, tumor progression and as a therapeutic target in glioblastoma. *Biochem Pharmacol*. 2016 (in press)

Pilorget A, Berthet V, Luis J, Moghrabi A, Annabi B, Béliveau R. Medulloblastoma cell invasion is inhibited by green tea (-)epigallocatechin-3-gallate. *J Cell Biochem*. 2003 Nov 1;90(4):745-55.

Didiano D, Shalaby T, Lang D, Grotzer MA. Telomere maintenance in childhood primitive neuroectodermal brain tumors. *Neuro Oncol*. 2004 Jan;6(1):1-8.

Chen TC, Wang W, Golden EB, Thomas S, Sivakumar W, Hofman FM, Louie SG, Schönthal AH. Green tea epigallocatechin gallate enhances therapeutic efficacy of temozolomide in orthotopic mouse glioblastoma models. *Cancer Lett*. 2011 Mar 28;302(2):100-8.

Lecumberri E, Dupertuis YM, Miralbell R, Pichard C. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate (EGCG) as adjuvant in cancer therapy. *Clin Nutr*. 2013 Dec;32(6):894-903

McLaughlin N, Annabi B, Lachambre MP, Kim KS, Bahary JP, Moumdjian R, Béliveau R. Combined low dose ionizing radiation and green tea-derived

epigallocatechin-3-gallate treatment induces human brain endothelial cells death. *J Neurooncol.* 2006 Nov;80(2):111-21

Kotecha R, Takami A, Espinoza JL. Dietary phytochemicals and cancer chemoprevention: a review of the clinical evidence. *Oncotarget.* 2016 (in press)

Maru GB, Hudlikar RR, Kumar G, Gandhi K, Mahimkar MB. Understanding the molecular mechanisms of cancer prevention by dietary phytochemicals: From experimental models to clinical trials. *World J Biol Chem.* 2016 Feb 26;7(1):88-99.

Rahmani AH, Al Shabrmi FM, Allemailem KS, Aly SM, Khan MA. Implications of Green Tea and Its Constituents in the Prevention of Cancer via the Modulation of Cell Signalling Pathway. *Biomed Res Int.* 2015;2015:925640.

Peter B, Bosze S, Horvath R. Biophysical characteristics of proteins and living cells exposed to the green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate (EGCg): review of recent advances from molecular mechanisms to nanomedicine and clinical trials. *Eur Biophys J.* 2016 (in press)

Wang X, Song KS, Guo QX, Tian WX. The galloyl moiety of green tea catechins is the critical structural feature to inhibit fatty-acid synthase. *Biochem Pharmacol.* 2003 Nov 15;66(10):2039-47.

Benelli R, Venè R, Bisacchi D, Garbisa S, Albini A. Anti-invasive effects of green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a natural inhibitor of metallo and serine proteases. *Biol Chem.* 2002 Jan;383(1):101-5.

Kazi A, Smith DM, Daniel K, Zhong S, Gupta P, Bosley ME, Dou QP. Potential molecular targets of tea polyphenols in human tumor cells: significance in cancer prevention. *In Vivo.* 2002 Nov-Dec;16(6):397-403.

Darvesh AS, Bishayee A. Chemopreventive and therapeutic potential of tea polyphenols in hepatocellular cancer. *Nutr Cancer.* 2013;65(3):329-44

Ulasov I, Yi R, Guo D, Sarvaiya P, Cobbs C. The emerging role of MMP14 in brain tumorigenesis and future therapeutics. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Aug;1846(1):113-20.

Ravishankar D, Rajora AK, Greco F, Osborn HM. Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013 Dec;45(12):2821-31.

Sharabi O, Shirian J, Shifman JM. Predicting affinity- and specificity-enhancing mutations at protein-protein interfaces. *Biochem Soc Trans*. 2013 Oct;41(5):1166-9.

Strongin AY. Proteolytic and non-proteolytic roles of membrane type-1 matrix metalloproteinase in malignancy. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Jan;1803(1):133-41.

Holmbeck K, Bianco P, Yamada S, Birkedal-Hansen H. MT1-MMP: a tethered collagenase. *J Cell Physiol*. 2004 Jul;200(1):11-9.

Brew K, Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Jan;1803(1):55-71.

Ries C. Cytokine functions of TIMP-1. *Cell Mol Life Sci*. 2014 Feb;71(4):659-72.

Yau T, Dan X, Ng CC, Ng TB. Lectins with potential for anti-cancer therapy. *Molecules*. 2015 Feb 26;20(3):3791-810.

Desjarlais M, Pratt J, Lounis A, Mounier C, Haidara K, Annabi B. Tetracycline derivative minocycline inhibits autophagy and inflammation in concanavalin-a-activated human hepatoma cells. *Gene Regul Syst Bio*. 2014 Mar 4;8:63-73.

Akla N, Pratt J, Annabi B. Concanavalin-A triggers inflammatory response through JAK/STAT3 signalling and modulates MT1-MMP regulation of COX-2 in mesenchymal stromal cells. *Exp Cell Res*. 2012 Nov 15;318(19):2498-506.

Annabi B, Lachambre M, Bousquet-Gagnon N, Pagé M, Gingras D, Béliveau R. Localization of membrane-type 1 matrix metalloproteinase in caveolae membrane domains. *Biochem J*. 2001 Feb 1;353(Pt 3):547-53.

Sina A, Proulx-Bonneau S, Roy A, Poliquin L, Cao J, Annabi B. The lectin concanavalin-A signals MT1-MMP catalytic independent induction of COX-2 through an IKKgamma/NF-kappaB-dependent pathway. *J Cell Commun Signal*. 2010 Mar;4(1):31-8.

Pratt J, Roy R, Annabi B. Concanavalin-A-induced autophagy biomarkers requires membrane type-1 matrix metalloproteinase intracellular signaling in glioblastoma cells. *Glycobiology*. 2012 Sep;22(9):1245-55.

Annabi, B., Thibeault, S., Lee, Y.T., Bousquet-Gagnon, N., Eliopoulos, N., Barrette, S., Galipeau, J., and Beliveau R. (2003) Matrix metalloproteinase regulation of sphingosine-1-phosphate-induced angiogenic properties of bone marrow stromal cells. *Exp. Hematol.* 31, 640-649

Meriane, M., Duhamel, S., Lejeune, L., Galipeau, J., and Annabi, B. (2006) Cooperation of matrix metalloproteinases with the RhoA/Rho kinase and mitogen-activated protein kinase kinase-1/extracellular signal-regulated kinase signaling pathways is required for the sphingosine-1-phosphate-induced mobilization of marrow-derived stromal cells. *Stem Cells.* 24, 2557-2565

Annabi, B., Thibeault, S., Mounmdjian, R., and Beliveau R. (2004) Hyaluronan cell surface binding is induced by type I collagen and regulated by caveolae in glioma cells. *J. Biol. Chem.* 279, 21888-21896

Bauvois B. (2004) Transmembrane proteases in cell growth and invasion: new contributors to angiogenesis? *Oncogene.* 23, 317-329

Abarrategi, A., Mariñas-Pardo, L., Mirones, I., Rincón, E., and García-Castro, J. (2011) Mesenchymal niches of bone marrow in cancer. *Clin Transl Oncol.* 13, 611-616

Moss, N.M., Wu, Y.I., Liu, Y., Munshi, H.G., and Stack, M.S. (2009) Modulation of the membrane type 1 matrix metalloproteinase cytoplasmic tail enhances tumor cell invasion and proliferation in three-dimensional collagen matrices. *J Biol Chem.* 284, 19791-19799

Gonzalo, P., Moreno, V., Gálvez, B.G., and Arroyo, A.G. (2010) MT1-MMP and integrins: Hand-to-hand in cell communication. *Biofactors.* 36, 248-254

Kanellopoulos, J.M., De Petris, S., Leca, G., and Crumpton, M.J. (1985) The mitogenic lectin from *Phaseolus vulgaris* does not recognize the T3 antigen of human T lymphocytes. *Eur J Immunol.* 15, 479-486

Ferriz-Martinez, R.A., Torres-Artega, I.C., Blanco-Labra, A., and Garcia-Gasca, T. (2010) The Role of Plant Lectins in Cancer Treatment. *Nova Science* 71-89.

Goutagny, N., Estornes, Y., Hasan, U., Lebecque, S., and Caux, C. (2012) Targeting pattern recognition receptors in cancer immunotherapy. *Target Oncol.* 7, 29-54

Grote, K., Schütt, H., and Schieffer, B. (2011) Toll-like receptors in angiogenesis. *Scientific World Journal.* 11, 981-991

- Kong, Y., and Le, Y. (2011) Toll-like receptors in inflammation of the central nervous system. *Int Immunopharmacol.* 11, 1407-1414
- Strongin, A.Y. (2010) Proteolytic and non-proteolytic roles of membrane type-1 matrix metalloproteinase in malignancy. *Biochim Biophys Acta.* 1803, 133-141
- Arroyo, A.G., Genís, L., Gonzalo, P., Matías-Román, S., Pollán, A., and Gálvez, B.G. (2007) Matrix metalloproteinases: new routes to the use of MT1-MMP as a therapeutic target in angiogenesis-related disease. *Curr Pharm Des.* 13, 1787-1802
- Byun, E.B., Choi, H.G., Sung, N.Y., and Byun, E.H. (2012) Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits TLR4 signaling through the 67-kDa laminin receptor on lipopolysaccharide-stimulated dendritic cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 426, 480-485
- Byun, E.H., Omura, T., Yamada, K., and Tachibana, H. (2011) Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits TLR2 signaling induced by peptidoglycan through the polyphenol sensing molecule 67-kDa laminin receptor. *FEBS Lett.* 585, 814-820

Annabi, B., Lachambre, M.P., Bousquet-Gagnon, N., Page, M., Gingras, D., and Beliveau, R. (2002) Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin 3-gallate inhibits MMP-2 secretion and MT1-MMP-driven migration in glioblastoma cells. *Biochim Biophys Acta*. 1542, 209-220.

Eisenach, P.A., Roghi, C., Fogarasi, M., Murphy, G., and English, W.R. (2010) MT1-MMP regulates VEGF-A expression through a complex with VEGFR-2 and Src. *J Cell Sci*. 123, 4182-4193

Umegaki, K., Sugisawa, A., Yamada, K., and Higuchi, M. (2001) Analytical method of measuring tea catechins in human plasma by solid phase extraction and HPLC with electrochemical detection. *J. Nutr. Sci. Vitaminol*. 47, 402-408

Yang, C.S., Chen, L., Lee, M.J., Balentine, D., Kuo, M.C., and Schantz, S.P. (1998) Blood and urine levels of tea catechins after ingestion of different amounts of green tea by human volunteers. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*. 7, 351-354

Cabrini G, Bezzerri V, Mancini I, et al. (2010) Targeting transcription factor activity as a strategy to inhibit pro-inflammatory genes involved in cystic fibrosis:

decoy oligonucleotides and low-molecular weight compounds. *Curr Med Chem.* 17(35):4392-4404.

Bamborough P, Morse MA, Ray KP. (2010) Targeting IKK β for the treatment of rheumatoid arthritis. *Drug News Perspect.* 23(8):483-490.

Chen S. (2011) Natural products triggering biological targets--a review of the anti-inflammatory phytochemicals targeting the arachidonic acid pathway in allergy asthma and rheumatoid arthritis. *Curr Drug Targets.* 12(3):288-301.

ABBREVIATIONS

BBB, blood-brain barrier; C, catechin; CNS, central nervous system; EC, epicatechin; ECM, extracellular matrix; EGC, epigallocatechin; EGCg, epigallocatechin gallate; GBM, glioblastoma; 67LR, 67k kDa laminin receptor; LRP-1, low-density-lipoprotein receptor-related protein-1; MMP-2, metalloproteinases-2; MT1-MMP, membrane type-1 matrix metalloproteinase, MTCBP-1, MT1-MMP cytoplasmic tail-binding protein-1; SPR, surface plasmon resonance; TIMP-2, tissue inhibitor of metalloproteinase-2; TNF, tumor necrosis factor

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

DD performed all the experiments and analyzed the data. BA conceived and coordinated the study. DD and BA contributed to the writing of the paper. All authors reviewed the results and approved the final version of the manuscript.

FIGURE LEGENDS

Fig.1 : Scheme of MT1-MMP predicted interactors and molecular structure of green tea-derived catechins. A) Algorithm was used to identify MT1-MMP interactors. MT1-MMP, membrane type-1 matrix metalloproteinase; MMP-2, matrix metalloproteinase-2, MTCBP-1, MT1-MMP cytoplasmic tail-binding protein-1; TIMP, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase. Chemical structure of B) ungalated catechins, and of C) equivalent gallated catechins which were used in cellular and acellular assays.

Fig.2 : Impact of catechins on Concanavalin-A-induced MT1-MMP expression in U87 glioblastoma cells. Serum-starved U87 glioblastoma cells were treated with 30 µg/ml ConA for 24 hours in the presence of 30 µM of each of either the ungalated catechins (C, GC, EC, EGC) or with equivalent gallated catechins (Cg, GCg, ECg, EGCg). A) Lysates were harvested upon treatment and immunoblots performed as described in the Methods section. B) Scanning densitometry was used to quantify the extent of ConA-mediated MT1-MMP induction.

Fig.3 : Impact of catechins on Concanavalin-A-induced GRP78 expression in U87 glioblastoma cells. Serum-starved U87 glioblastoma cells were treated

with 30 $\mu\text{g/ml}$ ConA for 24 hours in the presence of 30 μM of each of either the ungallated catechins (C, GC, EC, EGC) or with gallated catechins (Cg, GCg, ECg, EGCg). A) Lysates were harvested upon treatment and immunoblots performed as described in the Methods section. B) Scanning densitometry was used to quantify the extent of ConA-mediated GRP78 induction.

Fig.4 : Impact of catechins on Concanavalin-A-induced proMMP-2 activation in U87 glioblastoma cells. Serum-starved U87 glioblastoma cells were treated with 30 $\mu\text{g/ml}$ ConA for 24 hours in the presence of 30 μM of each of either the ungallated catechins (C, GC, EC, EGC) or with gallated catechins (Cg, GCg, ECg, EGCg). A) Conditioned media were harvested upon treatment and gelatin zymography performed as described in the Methods section. B) Scanning densitometry of the zymograms was used to quantify the extent of ConA-mediated proMMP-2 activation.

Fig.5 : Direct interaction assessment by SPR between MT1-MMP and catechins. Recombinant MT1-MMP was immobilized on CMC chips and increasing amounts of different catechins assessed for interaction by SPR as described in the Methods section. Representative sensograms are shown.

Fig.6 : Direct interaction assessment by SPR between MMP-2 and catechins.

Recombinant MMP-2 was immobilized on CMC chips and increasing amounts of different catechins assessed for interaction by SPR as described in the Methods section. Representative sensograms are shown.

Fig.7 : Direct interaction assessment by SPR between TIMP-2 and catechins.

Recombinant TIMP-2 was immobilized on CMC chips and increasing amounts of different catechins assessed for interaction by SPR as described in the Methods section. Representative sensograms are shown.

Fig.8 : Direct interaction assessment by SPR between MTCBP-1 and catechins.

Recombinant MTCBP-1 was immobilized on CMC chips and increasing amounts of different catechins assessed for interaction by SPR as described in the Methods section. Representative sensograms are shown.

Fig.9 : Direct interaction assessment by SPR between LRP-1 and catechins.

Recombinant LRP1-cluster IV (LRP1-C4) was immobilized on CMC chips and increasing amounts of different catechins assessed for interaction by SPR as described in the Methods section. Representative sensograms are shown.

Fig.10 : K_d constants and catechins affinity ranking towards MT1-MMP

interactors. Some of recombinant MT1-MMP interactors were immobilized

on CMC chips and increasing amounts of different catechins assessed for interaction by SPR as described in the Methods section. A) K_d constants were derived from representative sensograms, and B) affinity ranking towards the immobilized proteins depicted from catechins with low affinity to high affinity catechins. The gallated catechins were grouped into shadowed grey.

Figure.1

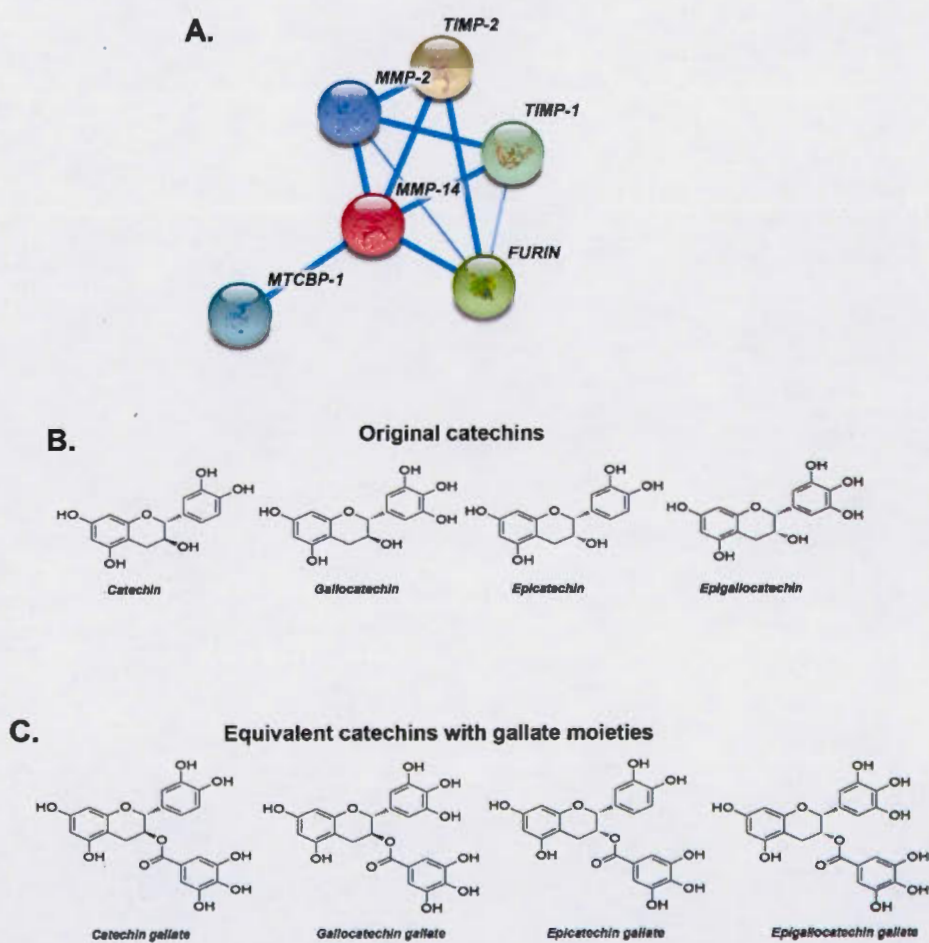


Figure.2

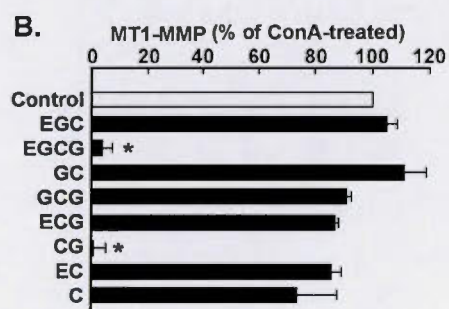
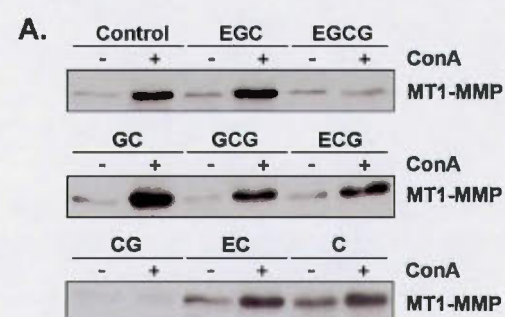


Figure.3

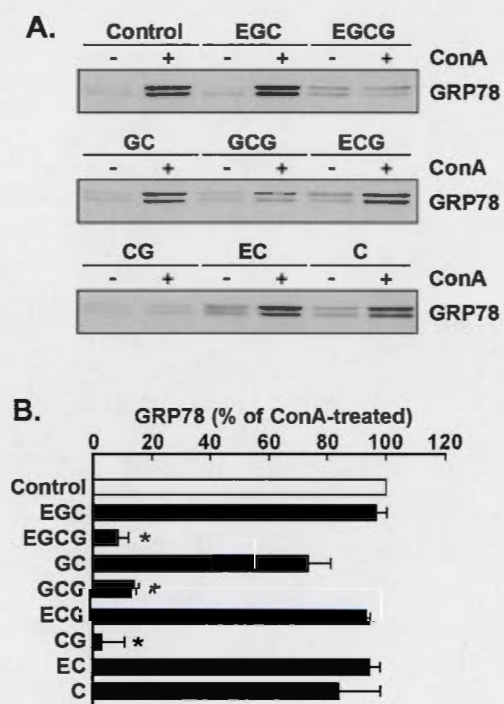


Figure.4

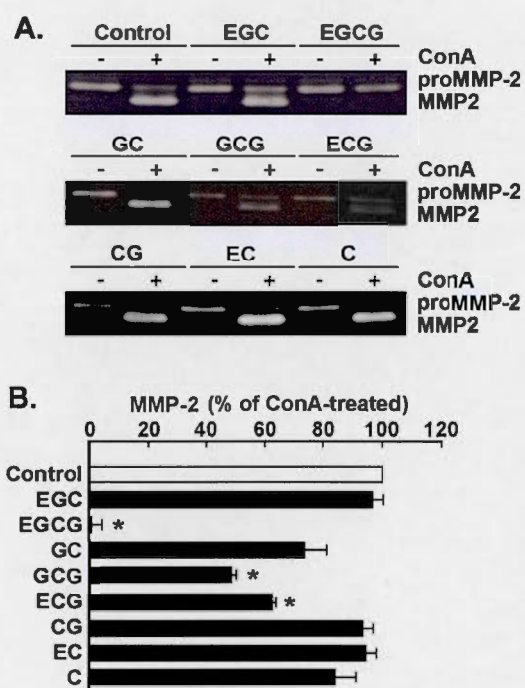


Figure.5

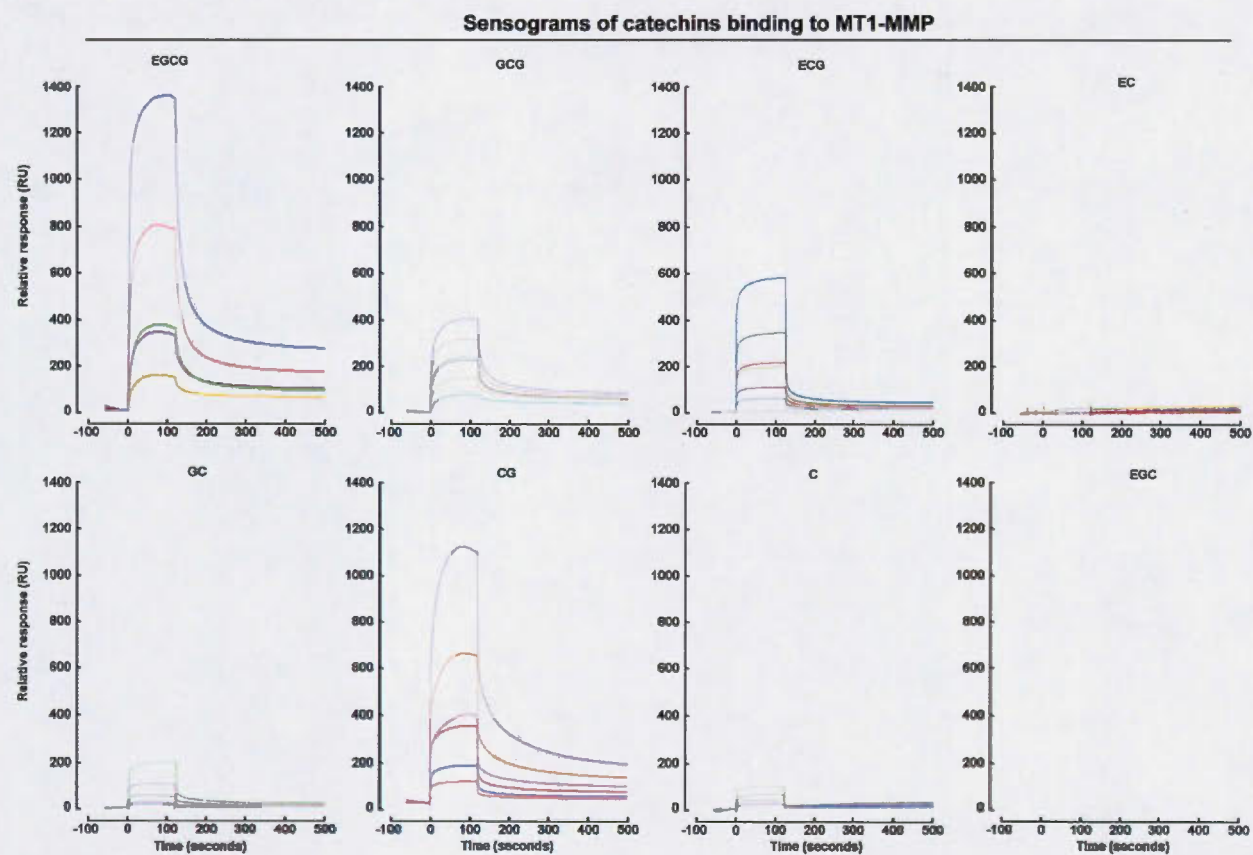


Figure.6

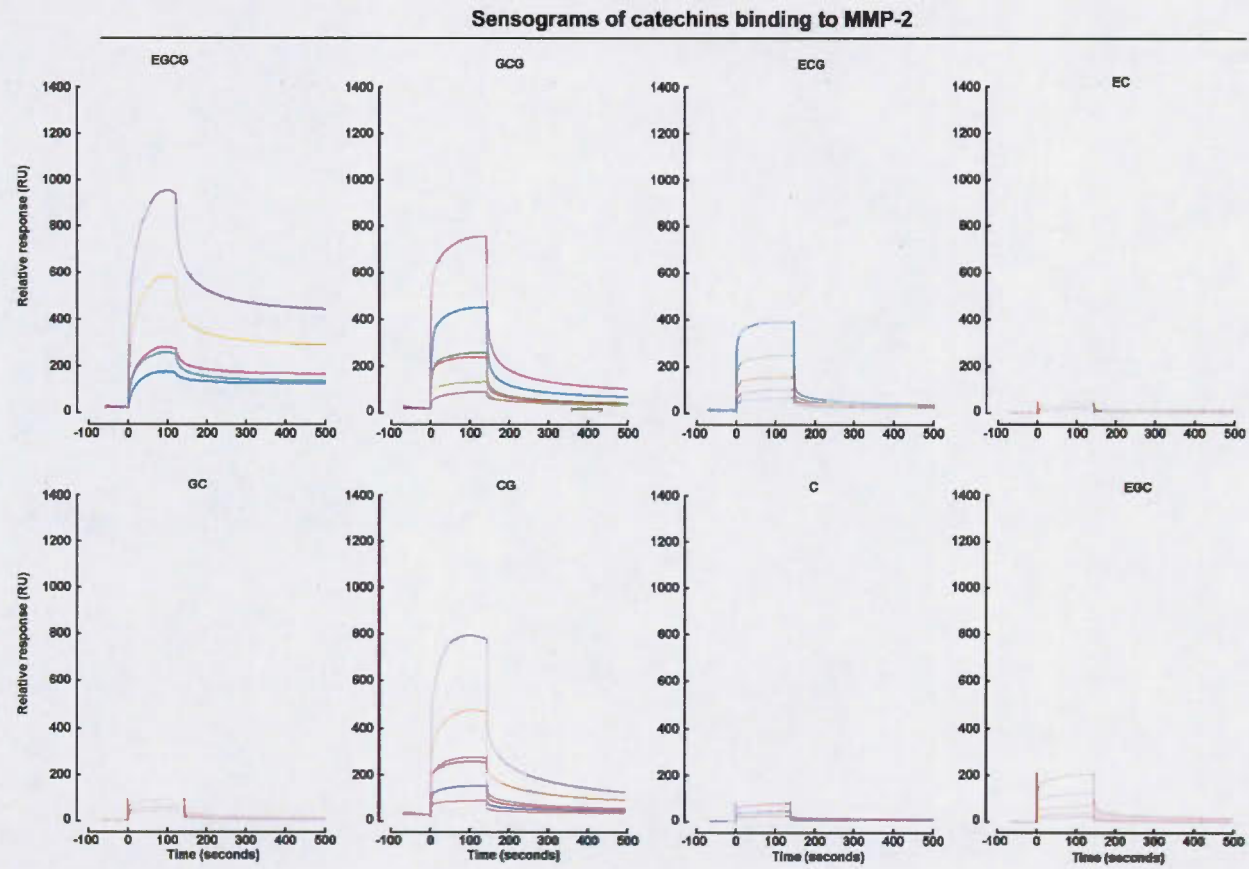


Figure.7

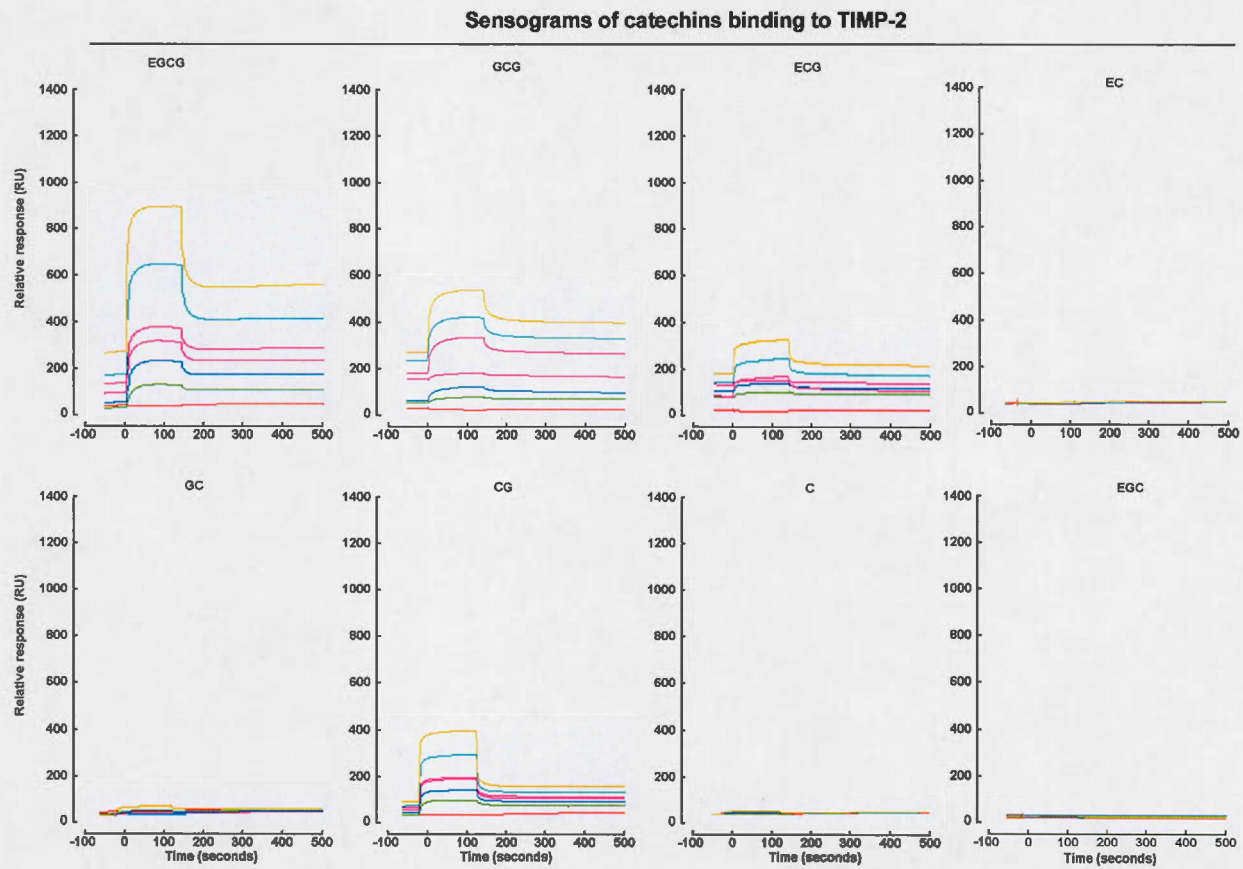


Figure.8

Sensograms of catechins binding to MTCBP-1

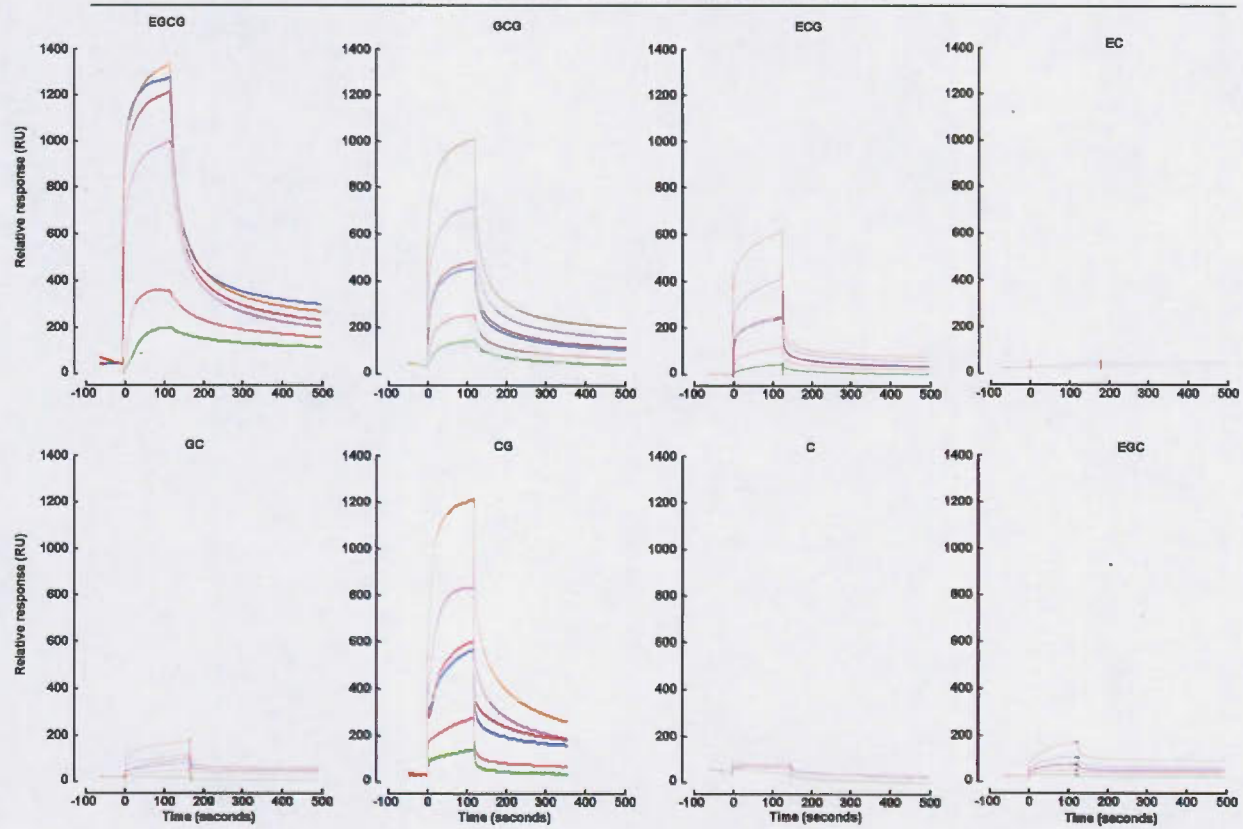


Figure.9

Sensograms of catechins binding to LRP1-C4

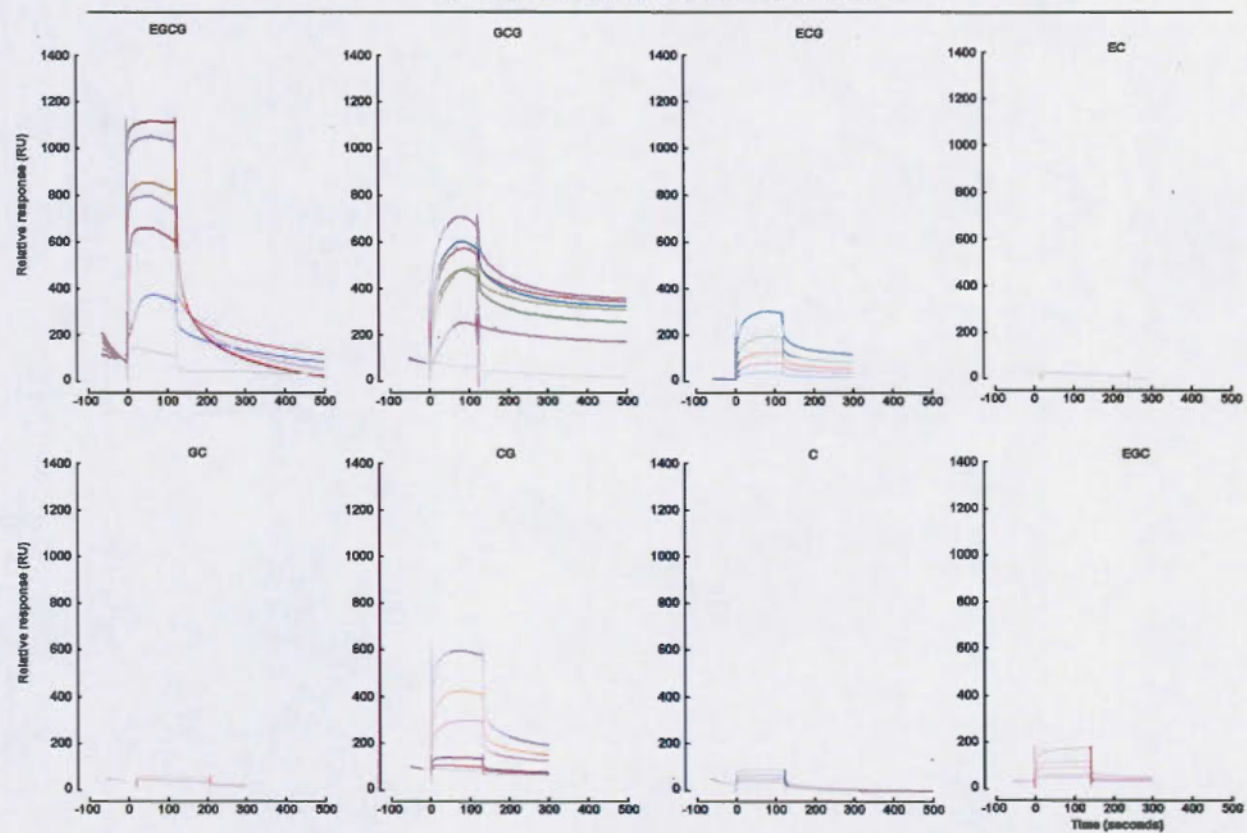


Figure.10

A.

| | Kd (nM) | | | | |
|------|---------|-------|--------|---------|------|
| | MT1-MMP | MMP-2 | TIMP-2 | MTCBP-1 | LRP1 |
| GCG | 220 | 380 | 52 | 74 | 1.5 |
| EGCG | 95 | 251 | 47 | 4.1 | 9.5 |
| EGC | 297 | 135 | 3 | 149 | 176 |
| GC | n.d. | 98 | 86 | 44 | n.d. |
| C | 293 | n.d. | 21 | n.d. | 285 |
| CG | 250 | 306 | 47 | 62 | 102 |
| ECG | 256 | 261 | 76 | 86 | 165 |
| EC | n.d. | 470 | 10 | n.d. | n.d. |

B.

| | | Affinity | | | | | | | |
|---------|----|----------|-----|-----|------|------|-----|------|--|
| TIMP-2 | GC | ECG | GCG | CG | EGCG | C | EC | EGC | |
| MMP-2 | C | EC | GCG | CG | ECG | EGCG | EGC | GC | |
| MTCBP-1 | C | EC | EGC | ECG | GCG | CG | GC | EGCG | |
| MT1-MMP | GC | EC | EGC | C | CG | ECG | GCG | EGCG | |
| LRP1 | GC | EC | C | EGC | ECG | GCG | CG | EGCG | |

CHAPITRE IV

DISCUSSION

Le cancer suscite à ce jour un énorme défi incitant à l'avancement de la recherche et à la mise au point d'approches thérapeutiques plus efficaces. Représentant plus de 50% de l'ensemble des tumeurs cérébrales, les gliomes sont les plus invasifs et les plus répandus chez l'adulte. Le traitement des tumeurs cérébrales repose actuellement sur l'ablation de la tumeur (chirurgie), la radiothérapie et la chimiothérapie. Toutefois, les mécanismes impliqués au niveau de la résistance à la radiothérapie ou à la chimiothérapie des cellules tumorales cérébrales restent à ce jour méconnus. La participation de la MT1-MMP a été clairement mise en évidence comme un acteur moléculaire important dans la résistance des cellules de gliomes. Or, un traitement avec des molécules anticancéreuses ciblant la fonction catalytique ou signalétique de la MT1-MMP pourrait agir conjointement avec la radiothérapie, afin d'optimiser l'efficacité des traitements des cellules de gliomes. La présente étude a permis pour la première fois d'évaluer l'affinité des catéchines avec différentes MMPs et substrats de la MT1-MMP, ainsi que leur capacité à inhiber la fonction catalytique de la MT1-MMP au niveau des cellules de glioblastomes humains.

Les résultats, peu concluants, à ce jour, des inhibiteurs synthétiques ciblant la fonction des MMPs solubles dans des essais cliniques alertent l'importance de mieux connaître les mécanismes d'action des MMPs impliquées dans la progression du cancer cérébral (Zucker et Cao, 2009). Les MMPs représentent une cible de choix dans le développement de nouveaux médicaments puisqu'elles contribuent directement au caractère invasif des tumeurs (Zucker et Cao, 2009).

Un criblage pharmacologique efficace des fonction catalytiques et signalétiques de la MT1-MMP passe par une meilleure compréhension des interactions moléculaires menant à différents processus moléculaires impliqués dans la progression tumorale. Une stratégie efficace contrant la progression tumorale semblerait être l'inhibition des mécanismes d'inflammation (Cabodi et Taverna, 2010). Ainsi, il serait envisageable d'avoir une régulation de la réponse inflammatoire et ce dans une approche anti-tumorigène (Schetter et al, 2010). L'utilisation de substances à la fois anti-inflammatoires et anti-oxydantes est donc nécessaire au freinage de la progression du cancer (Gupta, 2010). L'épigallocatechine 3-gallate (EGCG), un polyphénol prédominant retrouvé dans le thé vert, est le phytoélément chimio-préventif le plus étudié. Cette molécule nutraceutique est reconnue pour ses propriétés anticancéreuses (Pan et al, 2011). Des études précédentes ont démontré que l'EGCG peut moduler les voies de transduction de signaux impliquées au niveau de la prolifération, de l'inflammation, de l'apoptose et de l'invasion cellulaire cernant ainsi plusieurs étapes de la cancérogenèse. L'étude rapportée dans le présent mémoire met en évidence la capacité potentielle des catéchines, polyphénols du thé vert, à interagir avec une métalloprotéase membranaire, la MT1-MMP, ainsi que les divers partenaires de cette dernière soit, une métalloprotéase matricielle (MMP-2), un inhibiteur tissulaire de métalloprotéases (TIMP-2), une protéine de liaison à la queue cytoplasmique de MT1-MMP (MTCBP) et une lipoprotéine à faible densité (LRP1-Cluster IV). Cette étude permet, pour la première fois, de mesurer les interactions possibles et ainsi mettre en évidence les capacités de liaison directe des catéchines avec des protéines impliquées dans la progression du cancer. Afin d'atteindre notre objectif principal, nous avons fait appel à la résonance plasmonique de surface. Une telle méthode, très efficace dans la mesure des interactions entre biomolécules non marquées, nous a permis d'extraire des constantes de dissociation révélant ainsi l'affinité potentielle de chaque molécule de la famille des catéchines envers MT1-MMP, MMP-2, TIMP-2, MTCBP et LRP1-Cluster IV.

En premier lieu, cette étude avait pour objectif d'évaluer l'impact des catéchines dérivées du thé vert sur les fonctions de MT1-MMP et ses partenaires de liaison moléculaire par une approche cellulaire. En effet, grâce à la Concanavalline A (ConA), une lectine végétale naturelle, les cellules de glioblastomes U87 sont activées en déclenchant l'activation de la proMMP2 médiée par MT1-MMP, MT1-MMP et l'expression du biomarqueur de stress du réticulum endoplasmique GRP78. Ainsi, il est possible de constater que l'induction de la MT1-MMP médiée par la ConA est inhibée par l'EGCG et la catéchine gallate (CG). Un léger effet inhibiteur sur l'expression de MT1-MMP est constaté avec le GCG et l'ECG, cependant, il est statistiquement non significatif.

L'induction de l'inflammation et l'expression du biomarqueur de stress du réticulum endoplasmique (GRP78) induites par la conA ont également été observées. En effet, l'induction de GRP78 est inhibée par l'EGCG, le CG et le GCG. En ce qui concerne l'activation de la proMMP2, cette dernière est inhibée par l'EGCG, l'ECG et le GCG. Le processus d'activation de la proMMP2 nécessite la formation d'un complexe ternaire MT1-MMP/TIMP2/proMMP2 essentielle à la progression du cancer (Holmbeck et al, 2004). Collectivement, la plupart des catéchines portant un fragment gallate peuvent considérablement modifier soit la signalisation intracellulaire qui régule MT1-MMP induite par la conA, l'expression de GRP78 biomarqueur de stress du réticulum endoplasmique, ainsi qu'au niveau des processus d'activation de la proMMP2 dans les cellules glioblastomes U87.

En second lieu, une évaluation en temps réel de la phase d'association et de la phase de dissociation des catéchines avec MT1-MMP, lui même, ou ses partenaires permet de générer des sensogrammes. Selon ceux-ci, les molécules EGCG, GCG, ECG et CG, sembleraient avoir une grande affinité avec les protéines immobilisées, soit MT1-MMP, MMP-2, TIMP-2, MTCBP et LRP1-Cluster IV par rapport aux autres molécules qui ne montrent pas s'association avec MT1-MMP, lui même, ou avec ses

partenaires. Il est constatable selon le tableau des constantes (K_d en nM), que la molécule EGCG a une affinité de liaison avec un K_d de 95nM pour MT1-MMP, ce qui confirme que l'EGCG est une molécule de liaison à MT1-MMP. De plus, l'EGCG et le GCG ont des affinités de liaison avec un K_d de 135nM et 98nM, respectivement, pour MMP-2. Ainsi, selon les valeurs de K_d , la molécule GCG aurait une plus grande affinité que la molécule EGCG pour MMP-2. Ceci, peut être expliqué par la phase de dissociation de l'EGCG avec MMP-2 qui n'a pas été aussi bien effectuée que la phase de dissociation du GCG qui, elle, se dissocie parfaitement de MMP-2. En ce qui concerne la protéine TIMP-2, elle présente, dans l'ensemble, des valeurs de K_d relativement faibles, signifiant que les catéchines auraient probablement une plus grande affinité pour cette protéine. En effet, les molécules CG, ECG, EGCG, et GCG ont respectivement un K_d de 47, 76, 47, et 52nM pour la protéine TIMP-2. Pour ce qui est des substrats de MT1-MMP, la seule molécule ayant un K_d significatif par rapport aux autres molécules est l'EGCG, en effet, son affinité de liaison avec MTCBP est décrite par un K_d de 4,1nM. De plus, l'EGCG et le GCG ont également une affinité de liaison pour LRP1-Cluster IV avec des K_d de 9,5 et 8,9nM, respectivement.

De façon globale, lorsque les quatre catéchines, présentant un groupement gallate dans leur structure sont considérées, leurs interactions pour MT1-MMP sont significatives, avec la molécule EGCG ayant la plus forte affinité de liaison. Lorsque la liaison des catéchines est évaluée sur MMP2 ou sur TIMP2, les catéchines ayant un fragment gallate ciblent ces partenaires de MT1-MMP, contribuant ainsi à la formation du complexe ternaire. De façon surprenante, les catéchines avec fragment gallate semblent également cibler MTCBP de manière significative. Collectivement, ces observations suggèrent que les mécanismes de liaison des catéchines pourraient privilégier celles qui possèdent un groupement gallate au niveau de leur structure chimique.

En somme, le biocapteur de la MT1-MP a été utilisé avec succès pour cartographier l'interaction entre les catéchines et MT1-MMP par la résonance plasmonique de surface, en fournissant les détails de structure et de cinétique des interactions entre les catéchines et MT1-MMP. La compréhension des interactions entre ces biomolécules importantes au niveau moléculaire est d'une importance fondamentale pour le développement d'agents thérapeutiques hautement spécifiques. Le plus remarquable dans ces résultats est la concordance entre les affinités de liaison des molécules dérivées du thé vert avec l'effet inhibiteur de ces mêmes molécules sur MT1-MMP, GRP78 et sur l'activation de la MMP-2. Ces molécules, CG, ECG, EGCG et GCG se lient différemment selon les protéines à l'étude avec des affinités de liaisons variables. Pour la molécule ECG, l'affinité est similaire pour TIMP-2 et MTCBP. La molécule GCG, a une bonne affinité avec MMP-2, TIMP-2 et LRP1-Cluster IV. La catéchine qui se démarque est l'EGCG, celle-ci se lie efficacement à MT1-MMP, MMP-2, TIMP-2, MTCBP, et LRP1-Cluster IV par rapport aux autres catéchines. Ces catéchines ont en commun un aspect non négligeable, au niveau de leur structure moléculaire, qui présente un groupement gallate. Ce groupement gallate semble leur apporter une structure essentielle à la liaison aux MMPs et à leurs substrats.

L'EGCG a la capacité d'interagir à la surface des cellules avec des récepteurs protéiques. En effet, une interaction spécifique de l'EGCG avec le 67LR, récepteur à la laminine, est responsable de l'inhibition de la croissance des cellules de carcinomes pulmonaires (Tachibana et al, 2004). De plus, il semblerait que la catéchine (C), l'épicatéchine (EC) et l'épigallocatechine (EGC) sont incapables de se lier au 67LR (Tachibana et al, 2004). Toutefois, le mécanisme d'action des catéchines ayant un groupement gallate demeure inconnu. De précédentes études structure-fonction ont suggéré l'inhibition des esters de phorbol induite par l'expression de MMP-9 et HuR, par le groupement gallate des catéchines (Annabi et al, 2007). Les interactions

directes de ces catéchines avec MT1-MMP, lui même, ou avec ses partenaires restent malheureusement peu documentées.

Les multiples propriétés thérapeutiques que possèdent les catéchines ont déjà été rapportées. Ces effets thérapeutiques sont décrits comme préventifs sur l'obésité et sur les maladies cardiovasculaires et ce pour la forme d'une catéchine isolée et la forme d'extrait de thé vert dont elles proviennent majoritairement. De plus, elles possèdent des effets antioxydants, anticarcinogènes, antibactériens ou antiviraux (Khan et al., 2007). Le mode d'action des catéchines varie selon l'effet. Ainsi, leur effet anti-carcinogénicité dans le cas du cancer du sein ou de la prostate est lié à la cytotoxicité de l'EGCG sur les cellules cancéreuses (Stuart et al, 2006). Les différentes propriétés physico-chimique des catéchines sont bien décrites. Cependant, leurs liens avec l'activité biologique et les effets sur la santé demeurent encore méconnus. Ainsi, la connaissance de ces propriétés reste encore à approfondir afin de mieux connaître leurs effets.

CHAPITRE V

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'étude réalisée dans le cadre du présent mémoire avait pour but de mieux élucider les caractéristiques structurales et fonctionnelles de MT1-MMP en relation avec les catéchines. Nous rapportons pour la première fois, les interactions potentielles des catéchines dérivées du thé vert avec une MMP transmembranaire, MT1-MMP, responsable de déclencher une transduction de signal intracellulaire et extracellulaire qui régule la protéolyse de la MEC, essentielle dans les processus d'inflammation et d'angiogenèse associée aux tumeurs. En effet, nous avons évalué l'effet inhibiteur de quatre catéchines possédant un groupement gallate, dérivés du thé vert, sur des fonctions induites par MT1-MMP et leurs partenaires de liaison moléculaire, dans des conditions cellulaires sur des cellules U87 et des conditions acellulaires grâce à la résonance plasmonique de surface. La fonction gallate, dont disposent certaines catéchines, semblerait être impliquée dans l'inhibition de la MT1-MMP, l'inhibition du biomarqueur GRP78, ainsi que sur les fonctions protéolytiques de MT1-MMP.

Ainsi donc, à la suite de ces résultats, une première preuve structure-fonction est émise soutenant un rôle que pourrait avoir le groupement gallate des catéchines dans les processus oncogéniques impliquant la MT1-MMP. De plus en plus de thérapies anti-cancéreuses sont concernées par l'utilisation des inhibiteurs synthétiques des MMPs tout en les combinant avec les traitements de chimiothérapie et de radiothérapie habituels. Les molécules telles que les catéchines du thé vert pourraient être une option envisageable dans le but de prévenir et d'améliorer le traitement des glioblastomes.

RÉFÉRENCES

Abcam 2012. Inhibition of matrix metalloproteinases (MMPs). ABCAM.

Aggarwal, B.B et Shichodia, S. 2006. «Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer». *Biochemical Pharmacology*, vol. 71, no. 10, p. 1397-1421.

Akla, N., J. Pratt, et B. Annabi. 2012 « Concanavalin- A triggers inflammatory response through JAK/STAT3 signaling and modulates MT1-MMP regulation of COX-2 in mesenchymal stroma cells». *Exp Cell. Res*, vol. 318, no.19, p. 2498-2506.

Ando, K., T. Ishibashi, H. Ohkawara, N. Inoue, K. Sugimoto, H. Uekita, C Hu, Y. Okamoto, Y. Takuwa et Y. Takeishi. 2011. «Crucial role of membrane type-1 matrix mettaloproteinase(MT1-MMP) in RhoA/Rac independent signaling pathways in thrombin- stimulated endothelial cells». *J Atheroscler Thromb*, vol. 18, no. 9, p. 762-773.

Annabi, B., Currie, J., Moghrabi, A. et Beliveau, R. 2007. «Inhibition of HuR and MMP-9 expression in macrophage-differentiated HL-60 myeloid leukemia cells by green tea polyphenol EGCg». *Leukemia Research*, vol. 31, p. 1277-1284.

Annabi, B., M. Bouzeghrane, R. Moumdjian, A. Moghrabi et R. Béliveau. 2005. « Probing the infiltrating characters of brain tumors : inhibition of RhoA/ROK- mediated CD44 cell surface shedding from glioma cells by the green tea catechins EGCg». *J Neurochem*, vol. 94, no. 4, p. 906-916.

Ballabh, P., A. Brun et M. Nedergaard. 2004. « The blood-brain barrier : an overview structure, regulation and clinical implications». *Neurobiology of diseases*, vol. 16, no.1, p. 1-13.

Bergers G., K. Javaherian, K. M. Lo, J. Folkman D. Hanahan. 1999. « Effects of angiogenesis inhibitors on multistage carcinogenesis in mice». *Science*, vol. 284, p. 808-812.

Bhushan, M., Young, H. S., Brenchley, P. E. et Griffiths, C. E. 2002. «Recent advances in cutaneous angiogenesis». *Br J Dermatol*, vol. 147, no. 3, p. 418-425.

Bikfalvi, A. 2003. «Tumor angiogenesis». *Bull Cancer*, vol. 90, no. 5, p. 449-458.

Birkedal- Hansen, H., W. G. Moore, M. K. Bodden, L. J. Windsor, B. Birkedal- Hansen, A. DeCarlo et J. A. Engler. 1993. « Matrix metalloproteinases; a review». *Crit Rev Oral Biol Med*, vol. 4, no. 2, p. 197-250.

Brkic, M., S. Balusu, C. Libert, et R.E. Vandenbroucke. 2015. «Friends or foes: matrix metalloproteinases and their multifaceted roles in neurodegenerative diseases». *Mediators of inflammation*, vol. 2015, 27 pages

Cabodi, S., et D. Taverna. «Interfering with inflammation: a new strategy to block breast cancer self-renewal and progression ». *Breast Cancer Res*, vol. 12, no 2, p.305.

Chantrain C., Y.A. DeClerck. 2002. «Les métalloprotéinases matricielles et les inhibiteurs synthétiques dans la progression tumorale». *Medecine Science*, vol. 18, no. 5 p. 565-575.

Conner, S.D., et S.L. Schmid. 2003. « Regulates portals of entry into the cell». *Nature*, vol.422, no. 6927, p. 37-44.

Cornelius L.A., L. C. Nehring et E. Harding. 1998 «Matrix metalloproteinases generate angiostatin : effects on neovascularization». *J Immuno*, vol. 161, p. 6845-52.

Crawford H. C., B. M. Fingleton et L. A. Rudolph-Owen. 1999. «The metalloproteinase matrilysin is a target of b-catenin transactivation in intestinal tumors». *Oncogene*, vol. 18, p. 2883-91.

Demeule, M., Régina, A., Annabi, B., Bertrand, Y., Bojanowski, M. W. et Béliveau, R. 2004. «Brain endothelial cells as pharmacological targets in brain tumors». *Mol Neurobiol*, vol. 30, no. 2, p. 157-183.

Di Domenico, F., C. Foppoli, R. Coccia et M. Perluigi. 2012. «Antioxidants, in cervical cancer : chemopreventive and chemotherapeutic effects of polyphenols». *Biochim Biophys Acta*, vol.1822, no. 5, p. 737-747.

Fernandes, J., R. Cobucci, C. Jatob, T. de Medeiros Fernandes, J. de Azevedo, et J. Araújo. 2015. «The role of the mediators of inflammation in cancer development». *Pathology et oncology research*, vol. 3, p. 527-34.

Folkman, J. 1995. «Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid, and other disease». *Nature Medicine*, vol. 1, p. 27-30.

Folkman, J. 2006. «Angiogenesis». *Annual Review of Medicine*, vol. 57, p. 1-18.

Forget, M. A., Derosiers, R. R. et Béliveau, R. 1999. «Physiological roles of matrix metalloproteinases : Implication for tumor growth and metastasis». *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, vol. 77, no. 7, p. 465-480.

Friedl, P. et Wolf, K. 2003. «Tumour-cell invasion and migration : diversity and escape mechanisms». *Nat Rev Cancers*, vol. 3, no. 5, p. 362-374.

Gingras, D. et Béliveau, R. 1997. «L'angiogenèse tumorales : une nouvelle cible thérapeutique anticancéreuse». *Médecine Sciences*, vol. 13, no. 12, p. 1428-35.

Gingras, D. et Béliveau, R. 2014. «Prévenir le Cancer : Comment réduire les risques». Trécarré. 264 pages.

Gingras, D., et R. Béliveau, 2010. «Emerging concepts in the regulation of the membrane- type 1 matrix metalloproteinase activity». *Biochim Biophys Acta*, vol. 1803, no. 1, p.142-150.

Gupta, S. C., J. H. Kim, S. Prasad et B. B. Aggarwal. 2010. «Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals». *Cancer Metastasis Rev*, vol. 29, no. 3, p. 405-434.

Hanahan, D. et Folkman, J. 1996. «Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis». *Cell*, vol. 86, no. 3, p. 353-364.

Hanahan, D. et Weinberg, R. A. 2000. «The hallmarks of cancer». *Cell*, vol. 100, no. 1, p.57-70.

Hautamaki, R. D., Kobayashi, D. K. Senior, R. M. et Shapiro S. D. 1997. «Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice». *Science*, vol. 277, no. 5334, p. 2002-2004.

Hayakawa, T., K. Yamashita, E. Ohuchi, A. Shinagawa. 1994. «Cell growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2)». *J Cell Sci*, vol. 107, no. 9, p. 2373-2379.

Holmbeck, K., Bianco, P., Yamada, S., Birkedal-Hasen, H. 2004. «MT1-MMP: a tethered collagenase». *Journal Cell Physiology*, vol. 200, no. 1, p. 1-9.

Jason-Moller, L., M. Murphy, J. Bruno. 2006. «Overview of Biacore systems and their applications». *Current Protocols in Protein Science*, vol. 19.

Jönsson, U., L. Fägerstam, B. Ivarsson, B. Johnsson, R. Karlsson, K. Lundh, S. Löfås, B. Persson, H. Roos, I. Rönner. 1991. «Real-time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance and a sensor chip technology». *BioTechnique*, vol. 11, p. 620-627.

Khan, F., Liu, H., Reyes, A., Witkowska, H. E., Martinez-Avila, O., Zhu, L., Li, W. et Habelitz, S. 2013. «The proteolytic processing of amelogenin by enamel matrix metalloproteinase (MMP-20) is controlled by mineral ions». *Biochim Biophys Acta*, vol. 1830, no.3, p. 2600-2607.

Khan, N., D.J. Bharali, V.M. Adhami, I.A. Siddiqui, H. Cui, S.M. Shabana, S.A. Moussa et H. Mukhtar. 2014. «Oral administration of naturally occurring chitosan-based nanoformulated green tea polyphenol EGCG effectively inhibits prostate cancer cell growth in a xenograft model». *Carcinogenesis*, vol. 35, no. 2, p. 415-423.

Khan, N., F. Afaq, M. Saleem, N. Ahmad et H. Mukhtar. 2006. «Targeting multiple signaling pathways by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate». *Cancer Res*, vol. 66, no 5, p. 2500-2505.

Kleihues, P., D.N. Louis, B.W. Scheithauer, L.B. Rorke, G. Reifenberger, P.C. Burger et W.K. Cavenee. 2002. «The WHO classification of tumors of the nervous system». *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, vol. 61, no. 3, p. 215-225.

Lee S.W., W. Kim, J.A. Park, Y.K. Choi. 2006. «Blood-brain barrier interfaces and brain tumors». *Archives of Pharmacal Research*, vol. 29, no. 4, p. 265-275.

Liu, X., D.Y. Zhang, W. Zhang, X. Zhao, C. Yuan et F. Ye. 2011. «The effect of green tea extract and EGCG on the signaling network in squamous cell carcinoma». *Nutrition Cancer*, vol. 63, no. 3, p. 466-475.

Lochter A., S. Galosy, J. Muschler, N. Freedman, Z. Werb, et M. J. Bissell. 1997. «Matrix metalloproteinase stromelysin-1 triggers a cascade of molecular alterations that leads to stable endothelial to mesenchymal conversion and a premalignant phenotype in mammary endothelial cells». *J Cell Biol*, vol. 139, p. 1861-1872.

Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestel O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvett, A., Schethauer, B. W. et Kleihues, P. 2007. «The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system». *Acta Neuropathologica*, vol.114, p. 97-109.

Manach, C., A. Scalbert, C. Morand, C. Rémésy et L. Jiménez. 2004. «Polyphenols : food sources and bioavailability». *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 79, no. 5, p. 727-747.

Marchenko, G. N., Marchenko, N. D. et Strongin, A. Y. 2003. «The structure and regulation of the human and mouse use matrix metalloproteinase-21 gene and protein». *Biochem J*, vol. 372, no. 2, p. 503-515.

Martin, D.C., J. L. Fowlkes, B. Babic, R. Khokha. 1999. «Insulinlike growth factor II signaling in neoplastic proliferation id blocked by transgenic expression of the metalloproteinase inhibitor TIMP-1». *Cell Biol*, vol. 146, p. 881-892.

Méric, J.B., J.P. Spano. 2006. «Cyclooxygenase 2 et cancer : de la paille à la pratique clinique», *John Libbey eurotext*, vol. 93, p. 98-106.

Moore, C.S. et S. J. Crocker. 2012. «An alternate perspective on the roles of TIMPs and MMPs in pathology». *The American Journal of Pathology*, vol. 180, p. 12-16

Munoz-Chapuli, R. 2011. «Evolution of angiogenesis». *Int J Dev Biol*, vol.55, no. 4-5, p. 345-351.

Munoz-Chapuli, R., Quesada, A. R. et Angel Medina, M. 2004. «Angiogenesis and signal transduction in endothelial cells». *Cellular and Molecular Life Sciences*. Vol. 61, no. 17, p. 2224-2243.

Nagase, H., R. Visse, et G. Murphy. 2006 «Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs». *Cardiovasc Res*, vol. 69, p. 562-73.

Nelson A. R., B. Fingleton, M. L. Rothenberg, L. M. Matrisian. 2000. «Matrix metalloproteinases : biologic activity and clinical implications». *J Clin Oncol*, vol. 18, p. 1135-49.

Oh, J, Takahashi, R., Kondo, S., Mizoguchi, A., Adachi, E., Sasahara, R. M., Nishimura, S., Imamura, Y., Kitayama, H., Alexander, D. B., Ide, C., Horan, T. P., Arakawa, T., Yoshida, H., Nishikawa, S., Itoh, Y., Seiki, M., Itohara, S., Takahashi, C., Noda, M. 2001. «The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis». *Cell*, vol. 107, no. 6, p. 787-800.

Pan, M. H., Y. S. Chiou, Y. J. Wang, C. T. Ho et J. K. Lin. 2011 . «Multistage carcinogenesis process as molecular targets in cancer chemoprevention by epicatechin-3-gal late». *Food Funct*, vol. 2, no. 2, p. 101-110.

Pandey, K.B., et S.L. Rizvi. 2009. «Plant polyphenol as dietary antioxydants in humain health and disease». *Oxidative Medecine and Cellular Longevity*, vol. 2, no. 5, p. 270-278.

Rath, T., U Billmeier, M. Waldner, R. Atreya, et M. Neurath. 2015. «From physiology to disease and targeted therapy : interleukin-6 in inflammation and inflammation associated carcinogenesis». *Archives of toxicology*, vol. 89, no. 4, p. 541-554.

Rodrigues S., E. Bruyneel, C.M. Rodrigues, E. Shahin, et C. Gespach. 2004. «Cyclo-oxygénase 2 et carcinogénèse» *John Libbey eurotext*, vol. 91, p. 61-67.

Sagi, I, et J. Gaffney. 2015. «Matrix metalloproteinase» *Biology :Wiley-Blackwell*

Sakamoto, T., et M. Seiki. 2009. «Cytoplasmic tail of MT1-MMP regulates macrophage motility independenty from its protease activity». *Genes Cells*, vol. 14, no. 5, p. 617-26.

Schetter, A.J., N.H. Heegaard et C.C. Harris. 2010. «Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways». *Carninogenesis*, vol. 31, no. 1, p. 37-49.

Société Canadienne du Cancer. 2015. «Statistiques canadiennes sur le cancer : le cancer au Canada, les faits en bref».

Stuart, E.C., M.J. Scandlyn et R.J. Rosengren. 2006. «Role of epigallocatechin gallate (EGCG) in the treatment of breast and prostate cancer». *Life Sci*, vol. 79, no. 25, p. 2329-2336.

Tachibana, H., K. Koga, Y. Fujimura, et K. Yamada. 2004. «A receptor for green tea polyphenol EGCG». *Nat Struct Mol Biol*, vol. 11, p. 380-381.

Takahashi, C., Z. Sheng, T. P. Horan, H. Kitayama, M. Maki, K. Hitomi, Y. Kitaura, S. Takai, R. M. Sasahara, A. Horimoto, Y. Ikawa, B. J. Ratzkin, T. Arakawa et M. Noda. 1998. «Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK». *Proc Natl Acad Sci US A*, vol. 95, no. 22, p. 13221-13226.

Timpl, R. et Brown, L. C. 1996. «Supramolecular assembly of basement membranes». *BioEssays*, vol. 18, no. 2, p. 123-132.

Uekita, T., Y. Itoh, I. Yana, H. Ohno, M. Seiki. 2001. «Cytoplasmic tail-dependent internalization of membrane-type 1 matrix metalloproteinase is important for invasion promoting activity». *J Cell Biol*, vol. 155, no. 7, p. 1345-56.

Visse, R. et Nagase, H. 2003. «Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases : structure, function and biochemistry». *Circ Res*, vol. 92, no. 8, p. 827-839.

Vu, T. H. et Werb, Z. 2000. «Matrix metalloproteinases : Effectors of development and normal physiology». *Genes and Development*, vol. 14, no. 17, p. 2123-2133.

Witelock, J. M., A. D. Murdoch, R. V. Lizzo, P.A. Underwood. 1996. «The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor by stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanases». *J Biol Chem*. Vol. 271, p. 10079-86.

Zaveri, N.T. 2006. «Green tea and its polyphenolic catechins : medicinal uses in cancer and nanocancer application». *Life Sci*, vol. 78, p. 2073-80.

Zhang, F., K.B. Lee, R.J. Linhardt. 2015. «SPR biosensor probing the interactions between TIMP-3 and Herapin /GAGs». Biosensor, vol. 5, p. 500-512.